

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

"PEDRO KOURÍ"

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**"Virus del Herpes Humano 8 y
Sarcoma de Kaposi en Cuba"**

*Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas.*

Autor: Dra. Vivian Kourí Cardellá, MsC

Ciudad de la Habana

2005

Listado de abreviaturas:

aa: aminoácido, aminoacídica.

Ac: anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNg: ADN genómico.

Ag: antígeno.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BCBL: linfoma de la base de las cavidades del cuerpo, (siglas del inglés, *Body Cavity Base Lymphoma*)

Bcl-2: linfomas de células B, (siglas del inglés *B-cell lymphoma*), proteína inhibidora de la apoptosis.

BSA: albúmina bovina, (siglas del inglés *Bovine serum albumin*).

CD4: linfocito T CD4+.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

CMV: citomegalovirus.

CT: ciclo umbral de fluorescencia, (siglas del inglés *cycle treshold*)

DHFR: dihidrofolato reductasa.

E: especificidad.

EBNA: antígeno nuclear del VEB, (siglas del inglés *Epstein Barr Nuclear Antigen*).

ELISA: ensayo inmunoenzimático, (siglas del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

EC: enfermedad multicéntrica de Castleman.

EU: Estados Unidos.

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, (siglas del inglés *fibroblast growth factor*).

FLICE: enzima convertidora asociada a Fas similar al dominio de la Interleuquina 1 β , (siglas del inglés *Fas associated death domain-like interleuquin-1 β converting enzyme*).

g: gravedades.

GCR: proteína G acoplada al receptor, (siglas del inglés *G protein coupled receptor*)

HAART: terapia antirretroviral altamente efectiva, (siglas del inglés *highly active antiretroviral therapy*).

HASK: herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi.

HLA: antígenos leucocitarios de histocompatibilidad, (siglas del inglés *Histocompatibility Leucocyte Antigen*).

HSH: hombres que tienen sexo con hombres

HTF: heterosexuales femeninas

HTM: heterosexuales masculinos.

HVS: herpesvirus saimiri.

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

IFN: interferón.

IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

ITAM: motivo de activación de inmunoreceptor compuesto de tirosina, (siglas del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)

kb: kilobases.

LAMP: proteína de membrana latente, (siglas del inglés *latent membrane protein*).

LANA: antígeno nuclear asociado a la latencia, (siglas del inglés *Latency-associated nuclear antigen*).

LEP: Linfoma de Efusión Primario.

min: minutos.

MINSAP: Ministerio de Salud Pública.

MIP: proteína inflamatoria de macrófago, (siglas del inglés *macrophage inflammatory protein*).

NCAM: moléculas de adhesión celular neuronal, (siglas del inglés *neural cell adhesion molecule*).

NJ: neighbor joining.

nt: nucleótido, nucleotídica.

OncoM: oncostatina M.

ORF: marco de lectura abierta, (siglas del inglés *Open Reading Frame*).

pb: pares de bases.

PBS: solución salina tamponada con fosfatos, (siglas del inglés *Phosphate Buffer Solution*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, (siglas del inglés *Polymerase Chain Reaction*).

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, (siglas del inglés *platelet-derived growth factor*).

RR: ribonucleótido reductasa.

RTR: regiones terminales repetitivas

RUL: región única larga.

RVR: Radinovirus de los *rhesus*.

S: sensibilidad.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SK: Sarcoma de Kaposi.

SNC: sistema nervioso central.

STF: suero de ternera fetal.

Tat: proteína transactivadora, (siglas del inglés *transactivating protein*).

TGF: factor transformador del crecimiento, (siglas del inglés *transforming growth factor*).

Th: células T cooperadoras, (siglas del inglés *T helper*).

TK: timidina kinasa.

TPA: tetradecanoylphorbol-13-acetate.

TR: terminales repetitivas.

TS: timidilato sintasa.

v-CYC: ciclina viral

VDRL: prueba serológica para el diagnóstico de la Sífilis, (siglas del inglés *Venereal Disease Research Laboratory*).

VEB: virus de Epstein-Barr.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, (siglas del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*).

v-FLIP: proteína viral inhibitoria de FLICE, (siglas del inglés *Fas-associated death domain-like IL-1 beta-converting enzyme inhibitory protein*)

VHB: virus de la Hepatitis B.

VHC: virus de la Hepatitis C.

VHH6: virus del Herpes humano 6.

VHH7: virus del Herpes humano 7.

VHH8: virus del Herpes humano 8.

VHS: virus del Herpes Simple.

VIH: virus de la Inmunodeficiencia Humana.

v-IL6: interleuquina 6 viral.

v-IRF: factor regulador del interferón viral, (siglas del inglés *viral interferon regulatory factor*).

VPN: valor predictivo negativo.

VPP: valor predictivo positivo.

VPR: virus de la Pseudorrabia Porcina.

Síntesis

Se presentan los resultados sobre la prevalencia, distribución y epidemiología molecular del Virus del Herpes Humano (VHH8) y el Sarcoma de Kaposi (SK) en Cuba. Se determinó la seroprevalencia a VHH8 en cinco grupos de individuos cubanos así como la presencia de ADN de VHH8 en diferentes muestras de pacientes con SK encontrándose que el 82.2% y el 20.8% de pacientes con SK y de individuos seropositivos al VIH sin SK resultaron positivos de Acs al VHH8, respectivamente. De los donantes de sangre sólo el 1.2% presentaron Acs al virus y ninguno de los receptores de trasplante los tenía. El 66.6% de los contactos presentaron Acs al VHH8. Se detectó la presencia de ADN del VHH8 en el 97.2% de los tejidos de pacientes con SK y en el 63.6% de las muestras de saliva. La caracterización molecular del VHH8 en pacientes cubanos con SK Epidémico y en contactos sexuales de pacientes con SK infectados con el virus reveló un amplio rango de genotipos entre las muestras cubanas, incluyendo los B y A5, previamente reportados sólo en África. Finalmente, se diseñó un PCR en Tiempo Real para determinar carga viral de VHH8 en diferentes muestras, el que demostró que el 68.1% y el 100% de los contactos sexuales de pacientes con SK y los pacientes con SK, respectivamente estaban infectados con el virus; sin embargo, la carga viral de los primeros fue mucho más baja. Los resultados de este estudio permitieron obtener datos únicos que contribuyen a esclarecer la epidemiología y patogénesis del VHH8 y el SK en Cuba.

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción	
I.1 Antecedentes.....	1
I.2 Hipótesis de trabajo.....	5
I.3 Objetivos.....	5
I.4 Novedad científica.....	6
I.5 Valor teórico y práctico.....	6
I.6 Publicaciones científicas.....	7
I.7 Eventos científicos.....	8
Capítulo II. Revisión bibliográfica	
II.1 Virus del Herpes Humano 8 o Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi.....	10
II.2 Clasificación.....	12
II.3 Estructura viral y replicación.....	13
II.3.1 Estructura viral.....	13
II.3.2 Estructura genómica y organización.....	14
II.3.3 Piratería molecular de genes reguladores celulares.....	18
II.3.4 Replicación viral e infección de las células.....	18
II.4 Radinivirus relacionados.....	21
II.5 Historia natural de la infección por el HASK.....	22
II.6 Clasificación clínica-epidemiológica del Sarcoma de Kaposi.....	23
II.7 Características anatómopatológicas.....	24
II.8 Patogenia de los trastornos linfoproliferativos relacionados al HASK.....	28
II.9 Pruebas diagnósticas.....	32
II.9.1 PCR en Tiempo Real.....	35
II.10 Epidemiología.....	37
II.10.1 Distribución del SK en el mundo.....	37
II.10.2 Prevalencia del VHH8 en diferentes poblaciones.....	38
II.10.3 Transmisión.....	41
II.11 Origen y Evolución del VHH8.....	43
II.12 Tratamiento.....	47
II.12.1 Tratamientos locales.....	47
II.12.2 Tratamientos sistémicos.....	48
II.12.3 Tratamientos experimentales.....	48
Capítulo III. Materiales y Métodos	
III.1 Seroprevalencia de Acs en diferentes grupos de la población cubana sexualmente activa.....	50
III.1.1 Poblaciones estudiadas y muestreo.....	50
III.1.2 Determinación de anticuerpos en suero.....	51
III.1.3 Análisis estadístico.....	53
III.2 Detección de ADN del VHH8 en tejido y saliva de pacientes con SK.....	53
III.2.1 Muestras empleadas.....	53
III.2.2 Extracción de ADN y PCR.....	54
III.2.3 Caracterización de los pacientes cubanos con SK.....	57

III.3 Caracterización molecular del VHH8 en muestras clínicas de pacientes cubanos y alemanes.....	57
III.3.1 Muestras.....	57
III.3.2 Extracción de ADN y PCR.....	58
III.3.3 Secuenciación de ácidos nucleicos.....	59
III.3.4 Análisis filogenético.....	60
III.3.5 Procesamiento estadístico de los resultados.....	60
III.4 Determinación de la carga viral del VHH8 en pacientes con SK y en contactos sexuales asintomáticos	60
III.4.1 Poblaciones estudiadas y muestreo.....	60
III.4.2 Extracción de ADN.....	62
III.4.3 PCR en Tiempo Real.....	62
III.4.4 Análisis estadístico.....	63
Capítulo IV. Resultados y Discusión	
IV.1 Seroprevalencia de Acs en diferentes grupos de población cubana sexualmente activa.....	65
IV.1.1 Datos demográficos y epidemiológicos de los cinco grupos de individuos estudiados serológicamente.....	65
IV.1.2 Determinación de anticuerpos frente al VHH8 en los 5 grupos estudiados.....	66
IV.1.3 Análisis por subgrupos de la seropositividad a HASK entre sujetos positivos al VIH con y sin SK.....	68
IV.2 Detección de ADN del VHH8 en tejido y saliva de pacientes con SK.....	71
IV.2.1 Características, demográficas, clínicas y anatomopatológicas de los 72 pacientes cubanos con SK estudiados.....	71
IV.2.2 Detección de ADN del gen de la ADN polimerasa del VHH8 en tejido y saliva de pacientes con SK.....	75
IV.3 Caracterización molecular del VHH8 en muestras clínicas de pacientes cubanos y alemanes.....	77
IV.3.1 Resultados del PCR y la secuenciación de ácidos nucleicos.....	77
IV.3.2 Datos demográficos y clínicos de los pacientes.....	78
IV.3.3 Estudio Filogenético.....	79
IV.3.4 Genotipos, subtipos, variaciones en las regiones de la secuencia K1 y relevancia funcional.....	85
IV.4 Determinación de la carga viral del VHH8 en pacientes con SK y en contactos sexuales asintomáticos	91
IV.4.1 Diseño del PCR en Tiempo Real.....	91
IV.4.2 Muestras de pacientes.....	92
Capítulo V. Conclusiones	97
Capítulo VI. Recomendaciones	98
Capítulo VII. Referencias bibliográficas	99

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

El sarcoma de Kaposi (SK) fue descrito por primera vez por Moritz Kaposi en 1872 como un tumor raro de la piel de origen vascular que aparecía en hombres ancianos de origen mediterráneo o judío (Kaposi, 1872). A mediados del siglo XX se describió la forma endémica en África y posteriormente la forma iatrogénica (Taylor y cols., 1972; Harwood y cols., 1979; Ensoli y cols., 1999). El sarcoma de Kaposi asociado al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SK-SIDA) se reportó en la década de los 80, cuando se observa un incremento de este tumor en hombres que tienen sexo con hombres (HSH), lo cual constituyó uno de los primeros indicadores de la epidemia de SIDA (Jaffe y cols., 1983). De esta forma se establece una clasificación clínica de la enfermedad contemplando sus cuatro variantes: SK Clásico, SK Endémico, SK Iatrogénico o asociado a trasplante y SK Epidémico o asociado al SIDA.

El SK-SIDA se presenta en el 35% de los individuos en el curso de la enfermedad. Se plantea que el 95% corresponde a HSH y sólo pequeños porcentajes a otros grupos de riesgo como los hombres heterosexuales y las mujeres que tienen múltiples contactos sexuales (Talbot y Whitby, 1999).

Existe diversidad de criterios sobre el origen de las células del Sarcoma de Kaposi ya que se han encontrado varios tipos celulares (linfocíticas, endoteliales, monocitos, macrófagos, células dendríticas, entre otras) lo cual ha causado la controversia de si es realmente una neoplasia (expansión clonal de un tipo celular) o una hiperplasia reactiva (expansión policlonal) (Moore y Chang, 2001).

La etiología viral de la enfermedad fue sugerida por varios autores, pero no es hasta el año 1994 que un equipo de investigadores de la Universidad de Columbia publicó sus descubrimientos sobre un nuevo Herpesvirus como causante del SK (Chang y cols., 1994). Yuan Chang y Patrick Moore identificaron secuencias de Ácido desoxirribonucleico (ADN) de un herpesvirus no conocido hasta ese momento en lesiones de SK de pacientes con SIDA; sugiriendo que un nuevo

Gamma-2 herpesvirus, ahora denominado Virus del Herpes Humano 8 (VHH8) ó Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi (HASK) pudiera ser el agente causal de esta enfermedad (Chang y cols., 1994). Posteriormente, fue aislado también de pacientes con los otros tipos de SK, en pacientes con Linfoma de Efusión Primaria (LEP) y con Enfermedad de Castleman (EC) (Cesarman y cols., 1995a; Gessain y cols., 1996).

A partir de la identificación de este nuevo virus han surgido interrogantes alrededor de su epidemiología, modo de transmisión y su papel en la patogenia de la enfermedad.

Una vez conocido el genoma del virus se han realizado varios estudios para conocer sus mecanismos patogénicos. Se sabe que este virus codifica varios proto-oncogenes que producen una disregulación del control del ciclo celular, inhiben la apoptosis y el control de la diferenciación celular; todo lo cual puede contribuir a la formación del tumor (Moore y cols., 1996a y 1998).

Mucho se ha hablado sobre las posibles vías de transmisión de la enfermedad sin existir aún un consenso. Existen reportes de que el SK es 300 veces más frecuente en pacientes con SIDA que en otros pacientes inmunocomprometidos, 20 000 veces más común que en la población general (Talbot y Whitby, 1999), 20 veces más común en HSH con SIDA que en pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) por vías no sexuales (drogadictos y receptores de transfusiones) (Beral, 1991). Por otra parte, el SK se ha encontrado en HSH no infectados con el VIH (Friedman-Kien y cols., 1990) y en África, en individuos que adquirían el VIH por vía heterosexual (Beral, 1991).

El VHH8 ha sido también detectado en muestras de saliva de pacientes con SK-SIDA y en el lavado bronquioalveolar de pacientes con Kaposi pulmonar. Sin embargo, como el virus no ha sido aislado en la saliva de pacientes con SK clásico, ni en pacientes asintomáticos infectados con VHH8, el papel de la saliva en la transmisión de la enfermedad no está claro (Talbot y Whitby, 1999). Por otro lado, se ha detectado la presencia del VHH8 en el semen de pacientes con SK-SIDA, y también en algunos donantes voluntarios de semen en Estados Unidos

(EU) (Lin y cols., 1995; Corbellino y cols., 1996). Estos reportes sugieren la posible transmisión sexual del virus. Existen pocos estudios sobre la prevalencia de la infección del tracto genital femenino por VHH8 (Taylor y cols., 2004). Otro dato interesante es que el SK endémico, frecuente en África, se detecta en niños. En esta forma de presentación la vía de transmisión no sería la sexual, y pudiera entonces ser la vertical o por contacto a través de la saliva (Schwartz, 2004).

Se han encontrado secuencias de ADN del virus VHH8 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y en linfocitos B de pacientes con SK, lo que sugiere que el virus se encuentra diseminado en el organismo y que probablemente el compromiso del sistema inmunológico de los pacientes permite el incremento de la expresión del agente (Whitby y cols., 1995; Campbell y cols., 2003). Se ha demostrado que la seroconversión de anticuerpos (Acs) al VHH8 precede la aparición del SK y que la presencia de Acs frente al VHH8 es un indicador fiel de exposición pasada al virus (Moore y Chang, 2001; Schwartz, 2004).

El genoma del VHH8 consta de 140 a 165 kilobases (kb) y está constituido por una región única flanqueada en cada extremo por secuencias terminales repetitivas (TR) (Moore y cols., 1996b). Las secuencias genómicas de VHH8 colectadas en todo el mundo han revelado que el genoma es altamente conservado en su mayoría. Sin embargo, Zong y colaboradores en 1999 encontraron que en el extremo 5' del genoma, se encuentra el gen ORF (marco de lectura abierta, siglas del inglés *Open Reading Frame*) K1 que codifica para una proteína de membrana de 289 aminoácidos (aa) altamente glicosilada. Dicha proteína muestra un alto grado de variabilidad que difiere hasta un 60%, a nivel aminoacídico, en las regiones más variables (Zong y cols., 1999).

Basados en estos reportes se demostró la existencia inicial de cuatro genotipos (A, B, C y D) algunos de los cuales parecen estar relacionados geográficamente. Así, el genotipo B predomina en África y está más distante de los grupos A y C encontrados en Europa y EU. Por otra parte, el genotipo D se haya sólo restringido a habitantes de las islas del Pacífico (Poole y cols., 1999; Hayward, 1999). Un quinto subgrupo denominado E y relacionado al D, ha sido encontrado en poblaciones de Amerindios de Brasil y

Ecuador (Biggar y cols., 2000; Whitby y cols., 2004). Hasta el momento, sólo se han publicado estudios muy limitados en relación al gen ORF K1, principalmente en EU, Italia, Grecia, Rusia y África (Cook y cols., 1999; Zong y cols., 1999; Kadyrova y cols., 2003).

En Cuba, el SK era muy infrecuente antes de la era del SIDA; aún ahora, se encuentra restringido mayormente a pacientes seropositivos al VIH. Se han reportado 82 pacientes con SK-SIDA hasta el mes de Julio del 2004 (Datos obtenidos del Departamento de Anatomía Patológica del IPK), lo que representa aproximadamente un 1.4% de la población cubana viviendo con VIH (5888 hasta Noviembre del 2004, según el Registro Nacional de VIH del MINSAP). En los últimos años se ha observado en nuestro país un incremento en la aparición del SK-SIDA; ello se evidencia en que desde el comienzo de la epidemia de SIDA en Cuba en el año 1986 hasta 1997 sólo existían 21 pacientes con SK, sin embargo en los últimos 7 años se han diagnosticado 61 casos nuevos. Si se tiene en consideración que muchos de los primeros casos infectados con VIH en Cuba se contagiaron en África, se pudiera asumir que ellos también pudieran haberse infectado a la vez con el VHH8.

Con todas las evidencias planteadas anteriormente, consideramos muy oportuno e interesante el estudio del VHH8 y del SK en Cuba desde diferentes puntos de vista, y particularmente el estudio de su prevalencia en diferentes grupos de la población cubana, con bajo y elevado riesgo de infección por este virus; y el análisis molecular de del VHH8 en muestras cubanas que nos ayudaría a esclarecer algunas de las interrogantes acerca del origen y evolución de este virus no sólo en África y Europa, sino en la región del Caribe.

I.2 Hipótesis de trabajo

El Virus del Herpes Humano 8 se introdujo en Cuba a partir de diferentes regiones geográficas y circula con frecuencia en la población seropositiva al VIH, siendo la vía de transmisión sexual la más importante en la diseminación del virus.

I.3 Objetivos

General:

Contribuir al conocimiento del origen, la patogenia y la epidemiología del VHH8 y el Sarcoma de Kaposi en Cuba.

Específicos:

1. Determinar la prevalencia de anticuerpos al VHH8 en diferentes grupos de población cubana en edad sexualmente activa.
2. Determinar la presencia de ADN del VHH8 en tejido y en muestras de saliva de pacientes con SK.
3. Caracterizar molecularmente el VHH8 en pacientes con SK y en sus contactos sexuales sin evidencia clínica de SK.
4. Estudiar la carga viral del HASK en contactos sexuales sin evidencia clínica de SK y compararla con la de pacientes con SK.

I.4 Novedad científica

- Constituye el primer estudio de VHH8 y SK en Cuba.
- Es el primer reporte a nivel mundial de un estudio en contactos sexuales asintomáticos infectados con el VHH8 y de la presencia de genotipos africanos en América.
- Es importante para definir la circulación y el origen de este nuevo herpesvirus en la población cubana así como sus probables vías de transmisión.
- Nos permite conocer si existe relación entre la presencia de determinado genotipo con evolución de la enfermedad, transmisión e historia natural del VHH8 en los pacientes cubanos con SIDA.
- Todos estos aspectos son de gran relevancia para la salud pública y contribuyen a esclarecer los mecanismos de cómo las variaciones genéticas pueden contribuir al escape de la respuesta inmune del hospedero.

I.5 Valor teórico y práctico

Estos estudios hicieron posible determinar que el HASK ó VHH8 circula con frecuencia entre la población cubana seropositiva al VIH, no así en la seronegativa estudiada. Además, los hallazgos serológicos en contactos sexuales de pacientes con SK, indican que el virus se transmite por vía sexual aunque pudiera ser transmitido por contacto a través de la saliva. La caracterización molecular del VHH8 de pacientes cubanos nos permitió hacer algunas inferencias sobre el origen del mismo en nuestro país. Por último, con el empleo de métodos moleculares cuantitativos podríamos no sólo hacer un diagnóstico temprano en individuos infectados con el VHH8 de manera asintomática, sino también monitorear aquellos que se encuentran bajo tratamiento.

Algunos de los resultados presentados aquí han sido objeto de reconocimientos como son:

- Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2001.
- Premio Relevante en el XIV Forum Provincial en el año 2002.

Estos resultados, han sido objeto de 8 publicaciones internacionales y nacionales, además se han presentado en 10 eventos científicos nacionales e internacionales.

Los diferentes estudios realizados formaron parte de una Tesis de maestría en Virología y de una Tesis de Terminación de Residencia en Dermatología, ambas defendidas satisfactoriamente en 1998 y 2001, respectivamente.

Esta investigación forma parte de un Proyecto Ramal del MINSAP denominado "*Virus del Herpes Humano 8 (VHH8) y Sarcoma de Kaposi (SK) en Cuba. Caracterización Viroológica, Clínico-Epidemiológica e histológica*" que aún se encuentra en curso.

I.6 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis

- **Kourí V**, Marini A, Doroudi R, Nambiar S, Rodríguez M, Capo V, Resik R, Blanco O, Martínez A, Hengge U. Molecular Epidemiology of Kaposi Sarcoma Herpesvirus in Cuban and German patients with Kaposi's Sarcoma (KS) and asymptomatic sexual contacts of Cuban KS patients. 2005 **Virology** 337 (2):297-303.

- **Kourí V**, Liang X, Rodriguez ME, Capo V, Resik S, Barrios J, Mantecon B, Blanco O, Means R, Jung JU, Lee BS, Hengge U. Molecular Epidemiology and KSHV subtypes in Cuban AIDS-KS population. 2005 **AIDS** 19(9):984-987.

- Hengge UR, Tossing G, **Kourí V** and Fruehauf S. Graduated Systemic Treatment of AIDS-Associated Kaposi Sarcoma. In the Era of HAART. 2004 **Am J Cancer** 3 (3):133-149.

- **Kourí V**, Eng S, Rodríguez ME, Resik S, Orraca O, Moore P, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) seroprevalence in Cuban populations. 2004 **Rev Panam Salud Pública** 15(5):320-325.

- **Kourí V**, Liang X, Rodriguez ME, Capo V, Resik S, Barrios J, Mantecon B, Blanco O, Means R, Jung JU, and Lee BS. Molecular Characterization of KSHV subtypes in Cuban AIDS-KS population. 2004 **Int J Infect Dis** 8 (Suplem. 1):1201-9712.

- **Kourí V**, Resik S, Enamorado A, Moreno D, García S, Acosta B, Morier L, Gonzalez L. Longitudinal Study of Herpesviruses in Kidney Transplant Recipients in Cuba. 2003 **Clinical Infectious Disease** 36:818-821.

- **Kourí V**, Rodríguez ME, Infante E, Arteaga E, Capó V, Blanco V, Resik S, Moore P. Sarcoma de Kaposi y Virus del Herpes Humano 8 (VHH8) en Cuba. 2002 **Revista Latinoamericana de Microbiología** 44(4) Suplemento.

- Resik S, **Kourí V**, Soto Y, Acosta B, Rodríguez ME, Muné M, et al. Contribución al diagnóstico de algunas infecciones oportunistas en el paciente inmunocomprometido. 2001 ***Biotecnología Aplicada*** 18:107-108.

I.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- II Conferencia Internazionale di Dermatologia '99, Cuba (1999). Anticuerpos al Virus del Herpes Humano 8 en diferentes grupos de la población cubana. **Vivian Kourí**, Sybil M. Eng, María E. Rodríguez, Sonia Resik, Odalys Orraca, Patrick S. Moore, and Yuan Chang.
- International Symposium on HIV, Leukemia, and Opportunistic Cancers, Marrakech, Morocco (1999). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) seroprevalence in various populations in Cuba. **Vivian Kourí**, Sybil M. Eng, María E. Rodríguez, Sonia Resik, Odalys Orraca, Patrick S. Moore, and Yuan Chang.
- IV Conferencia Internacional sobre el VIH/SIDA en Cuba, Centroamérica y el Caribe (2000). Seroprevalencia del Virus del Herpes Humano 8 en diferentes grupos de la población cubana. **Vivian Kourí**, Sybil M. Eng, María E. Rodríguez, Sonia Resik, Odalys Orraca, Patrick S. Moore, and Yuan Chang.
- XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical (2002). Virus del Herpes Humano 8 y Sarcoma de Kaposi en Cuba. **Vivian Kourí**, Ma Elena Rodríguez, Ena Infante, Ernesto Arteaga, Virginia Capó, Orestes Blanco, Sonia Resik, Beatriz Mantecón, Antonio Tenorio, Francisco Pozo, Sybil Eng, Yuan Chang, Patrick Moore.
- 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología. 3er Congreso Cubano de Inmunología. 9-13 Diciembre 2002. Virus del Herpes Humano en Cuba. **Vivian Kourí**, Ma Elena Rodríguez, Ena Infante, Ernesto Arteaga, Virginia Capó, Orestes Blanco, Sonia Resik, Beatriz Mantecón, Antonio Tenorio, Francisco Pozo, Sybil Eng, Yuan Chang, Patrick Moore.
- II Foro en VIH /SIDA/ITS en América Latina y el Caribe. 7-12 Abril 2003. Virus del Herpes Humano 8 y Sarcoma de Kaposi en Cuba. **Vivian Kourí**, Ma Elena Rodríguez, Ena Infante, Ernesto Arteaga, Virginia Capó, Orestes Blanco, Sonia Resik, Beatriz Mantecón, Antonio Tenorio, Francisco Pozo, Sybil Eng, Yuan Chang, Patrick Moore.
- XI International Congress of Infectious Diseases. Cancún. Mexico. Marzo 2004. Molecular Epidemiology and KSHV subtypes in Cuban AIDS-KS population. **Vivian Kourí**, Xiaozhen Liang, Maria Elena Rodriguez, Virginia Capo, Sonia Resik, Julio Barrios, Beatriz Mantecon, Orestes Blanco, Robert Means, Jae U Jung, and Bok-Soo Lee.

- IV Congreso Nacional de Inmunología. Cuba. 17-20 Noviembre 2004. Molecular Epidemiology and KSHV ORF K1 subtypes in Cuban AIDS-KS population. **Vivian Kouri**, Xiaozhen Liang, Maria Elena Rodriguez, Virginia Capo, Sonia Resik, Julio Barrios, Beatriz Mantecon, Orestes Blanco, Robert Means, Jae U Jung, Bok-Soo Lee and Ulrich Hengge.

- Dermatology Forum. Cologne. Alemania. Noviembre 2004. Molecular Epidemiology of Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's Sarcoma (KS). **Vivian Kourí**, Alessandra Marini, Roya Doroudi, Ulrich R. Hengge.

- 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Dinamarca. 2-5 Abril. 2005. Molecular Epidemiology of Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's Sarcoma (KS) and asymptomatic sexual contacts of Cuban KS patients. **Vivian Kourí**, Alessandra Marini, Roya Doroudi, Maria E. Rodriguez, Virginia Capo, Sonia Resik, Martínez PA, Ulrich R. Hengge.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Virus del Herpes Humano 8 (VHH8) o Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi (HASK)

El Virus del Herpes Humano 8 ó Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi es el virus tumoral humano más recientemente descrito. Existen actualmente sólo tres enfermedades proliferativas asociadas con la infección por HASK: El SK, el LEP ó Linfoma de las Base de las cavidades del cuerpo y la EC, en su variante celular plasmática.

El SK fue descrito por primera vez por Moritz Kaposi en 1872, como un tumor agresivo no doloroso que afectaba a hombres ancianos de origen mediterráneo. Posteriormente, fue descrito también en África (Taylor, 1972; Ziegler y Katongole, 1996). Con el inicio de la epidemia de SIDA, apareció una forma particularmente agresiva de SK, la que puede diseminarse y conducir a la muerte del paciente (Jaffe y cols., 1983). EL SK en personas severamente inmunodeprimidas, como son los receptores de trasplante, también puede progresar rápidamente (Harwood y cols., 1979).

El VHH8 es uno de los patógenos que han sido descubiertos al aplicar los métodos de biología molecular (Relman, 1999). El mismo fue identificado a partir de una lesión de piel de un paciente con SK asociado a SIDA en el año 1993, usando la técnica denominada análisis de diferencias representativas, un proceder basado en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), seguido de una hibridización sustractiva que permitió aislar dos pequeños fragmentos del genoma viral (Chang y cols., 1994). La detección del ADN viral se extendió luego a las otras formas del SK no relacionadas al VIH (Ambroziak y cols., 1995; Boshoff y cols., 1995a; Collandre y cols., 1995; de Lellis y cols., 1995; Dupin y cols., 1995; Moore y Chang, 1995), así como al LEP (Cesaman y cols., 1995a) y a la EC (Soullier y cols., 1995).

La identificación de una línea celular derivada de LEP (Cesaman y cols., 1995b; Komanduri y cols., 1996) condujo al desarrollo de la primera generación de pruebas serológicas usadas en la caracterización de la biología y epidemiología del virus (Gao y cols., 1996 a y b; Kedes y cols., 1996; Lennette y cols., 1996; Miller y cols., 1996).

Dos años después del descubrimiento del virus se logró obtener la secuencia completa de su genoma a partir de lesiones de pacientes con LEP (Russo y cols., 1996) y de SK (Neipel y cols., 1997).

Un hallazgo llamativo en el VHH8 es que, de forma similar a otros radinovirus, (Albrecht y cols., 1992; Neipel y cols., 1998) este virus ha capturado un número reconocible de ADNs del ciclo celular en su genoma (piratería molecular). Estos genes juegan un papel regulador importante en el mantenimiento y propagación del virus en el ambiente hostil de la célula huésped. Aunque la mayoría de estos genes "piratas" son únicos del VHH8, un análisis más profundo ha revelado que ellos afectan las mismas vías de señales celulares moduladas por proteínas virales de otros herpesvirus, particularmente del Virus de Epstein-Barr (VEB) (Moore y Chang, 1998).

El conocimiento de la epidemiología del VHH8 y su papel en los tumores asociados a inmunodepresión ha aumentado rápidamente desde su descubrimiento (Sarid y cols., 1998 y 1999). Sin embargo las bases moleculares para su patogenicidad están actualmente bajo investigación. El hombre es el único hospedero conocido y las pruebas serológicas disponibles en el momento actual permiten detectar la mayoría de los casos infectados. A diferencia de los otros herpesvirus, este nuevo agente no es ubicuo y sólo una pequeña minoría de personas son positivas al VHH8 (Schwartz, 2004). Sin embargo, en algunas regiones del mundo, incluyendo grandes áreas de África, existe un gran número de individuos con evidencia de exposición al virus (Wilkinson y cols., 1999). La infección con el VHH8 se caracteriza por un período de latencia prolongado que se presume sea por toda la vida. Por ello, los portadores sanos de la infección por el VHH8 pudieran desarrollar tumores relacionados al VHH8 años después de la infección primaria, particularmente después de la infección con el VIH o de recibir tratamiento inmunosupresor para prevenir el rechazo al trasplante (Schulz, 2000; Avery, 2004).

A pesar del progreso en el conocimiento de la biología molecular y la epidemiología de este agente, su caracterización virológica se ha visto obstaculizada por dificultades en el cultivo del VHH8 *in vitro*. Por esta razón no se han podido realizar experimentos genéticos con virus delecionados, métodos éstos que han sido usados exitosamente

para definir la biología de otros herpesvirus como el Virus del Herpes Simple tipo-1 (VHS-1) y el VEB. Además, se conoce poco de las interacciones entre múltiples genes del VHH8 *in vivo*.

Finalmente, el conocimiento de la inmunidad mediada por células generada por el VHH8, crítica para la comprensión de la patogenia y el desarrollo de vacunas, se encuentra en un estadio inicial. A pesar de estos obstáculos, el VHH8 constituye un nuevo e importante modelo de estudio de la virología tumoral humana.

II.2 Clasificación

El VHH8 ó HASK pertenece al género Radinivirus o *Gamma-2* herpesvirus, incluido en la subfamilia *Gammaherpesvirinae* dentro de la familia *Herpesviridae* (Figura 1). Está estrechamente relacionado al herpesvirus saimiri (HVS) de los monos ardilla, el prototipo y más extensamente estudiado de los radinivirus antes del descubrimiento del VHH8. El VHH8 es el único radinivirus humano identificado hasta la actualidad (Albrecht y cols., 1992; Berend y cols., 1993; Duboise y cols., 1998).

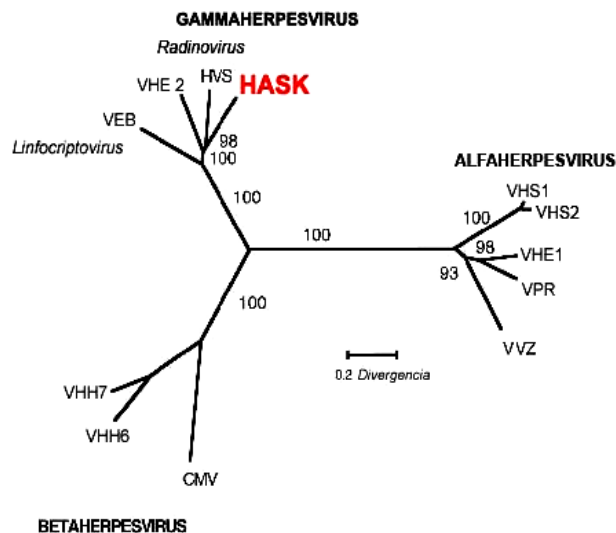


Figura 1. Árbol filogenético de la familia *Herpesviridae*, donde aparece la relación del Herpesvirus Asociado al sarcoma de Kaposi (HASK) con los otros Herpesvirus. Tomado del Fields, *Virology*, 2001.

II. 3 Estructura Viral y replicación

II.3.1 Estructura Viral

El VHH8 es un virus grande, su tamaño puede variar desde 120 hasta 300 nanómetros (nm), es envuelto, con genoma de ADN de doble cadena que

comparte muchas de las características de los otros Herpesvirus (Moore y Chang, 2001). Los viriones del HASK tienen una nucleocápside electrodensa rodeada por un tegumento amorfo con material proteináceo y una envoltura formada por una bicapa lipídica (Renne y cols., 1996). La reconstrucción tridimensional de la cápside del VHH8, observada por criomicroscopía muestra que tanto el tamaño como la organización estructural es similar a los otros herpesvirus previamente estudiados (Figura 2) (Trus y cols., 2001). El VHH8 tiene glicoproteínas estructurales similares a las usadas por otros herpesvirus para la entrada a la célula y para la replicación del virión (Pertel y cols., 1998). Partículas similares a herpesvirus fueron encontradas por microscopía electrónica en lesiones de SK asociado a SIDA desde el año 1984 (Walter y cols., 1984).

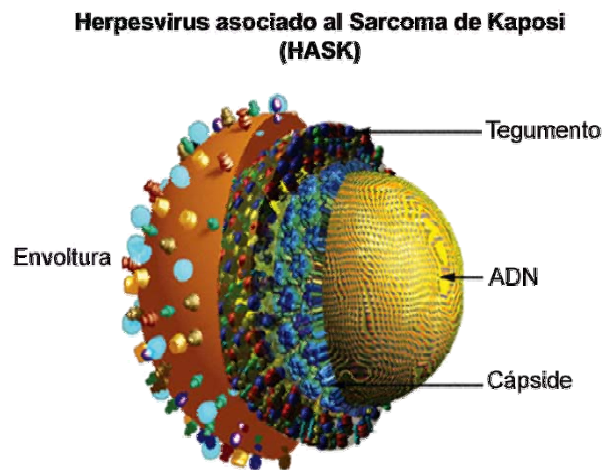


Figura 2. Representación esquemática del HASK. Tomado de *PRN notebook 2002;7:1*.

II.3.2 Estructura genómica y organización

El genoma consta de 140 a 165 kb de longitud y consiste en una región única larga (RUL); contiene al menos 87 genes, y es flanqueado por regiones terminales repetitivas (RTR) (Moore y cols., 1996b) (Figura 3). Existen números variables de unidades terminales repetitivas en cada virus y estas variaciones permiten hacer ensayos de monoclonalidad dentro de las células (Judde y cols., 2000). Cada unidad repetitiva de 801-pb tiene un alto contenido en G+C (85%) y señales de división de secuencias (Russo y cols., 1996).

La organización genética de las RUL es similar a aquellas del HVS, por lo que los genes del HASK son consecutivamente nombrados de manera similar, excepto para los tres primeros genes del HVS, que no se encuentran representados en el genoma del VHH8 (Russo y cols., 1996; Neipel y cols., 1997). Nuevos genes continúan siendo descritos a partir de estudios de transcripción, ya que las anotaciones iniciales del genoma fueron a propósito conservativas. Los genes que no han sido similares a los del HVS se les ha introducido el prefijo K (ORF K1 a K15) e incluye muchos de los genes homólogos celulares (Moore y Chang, 2001; Zong y cols., 1999 y 2002).

celulares (Moore y cols., 1996a y 1996b), los mismos se relacionan a continuación y se resumen en la Tabla 1.

- **Citoquinas:** gen homólogo a la interleuquina 6 (v-IL6) el cual es un factor funcional para el crecimiento de células B y un regulador negativo de la apoptosis.
- **Quimoquinas:** Tres genes virales con homología al gen que codifica para la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP, del inglés *Macrophage Inflammatory Protein*) denominados vMIP-I, vMIP-II y vMIP-III. Todos son angiogénicos *in vitro*. Además, el vMIP-II es un antagonista ampliamente activo de las quimoquinas celulares y puede inhibir la infección por el VIH-1 (Moore y cols., 1996a y 1996b).
- **Genes de respuestas de citoquinas:** Un homólogo del factor regulador del interferón (v-IRF, del inglés *Interferon Regulatory Factor*). El mismo puede conferir resistencia a los efectos anti-proliferativos del interferón alfa. También interactúa con la proteína co-activadora transcripcional p300 para alterar la expresión de genes, y puede regular positivamente la expresión de *c-myc*, el cual promueve la progresión del ciclo celular.
- **Receptores celulares:** se han encontrado genes homólogos del receptor del complemento (CR2/CD21), una molécula de adhesión (NCAM) y una molécula de superficie de células T con propiedades inmunosupresoras.
- **Genes reguladores del crecimiento:** un homólogo a la ciclina D codificado por ORF72. El mismo forma un complejo activo de ciclina, que es resistente a las vías normales de control del crecimiento. Como resultado, la ciclina viral (v-CYC) previene el arresto del ciclo normal G1 de la proliferación celular.
- **Proteína G acoplada al receptor:** ORF74 (vGCR, del inglés *G Protein Coupled Receptor*) puede estimular las vías de señales acopladas a la proliferación celular, y puede actuar como un oncogen *in vitro*; este producto génico puede además estimular la liberación de factores angiogénicos potentes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growing Factor*) en respuesta a la unión con quimoquinas celulares.

- **Inhibidores de la apoptosis:** un homólogo de bcl-2 (*vbcl-2*), el cual puede inhibir la apoptosis; una proteína inhibidora FLICE (*v-FLIP*) que puede prevenir la muerte celular mediada por Fas.
- **Síntesis de ADN y replicación:** Al igual que los otros herpesvirus, el VHH8 contiene genes para las enzimas ribonucleótido reductasa (RR), dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina kinasa (TK) y timidilato sintasa (TS).

Tabla 1. Propiedades funcionales de algunos genes reguladores del HASK.

Gen HASK	Proteína HASK	Función
ORF K1	K1	Proteína de membrana constitutivamente activa, conteniendo un motivo ITAM. Transforma fibroblastos de roedores y células T primarias. Ectodominio variable usado para análisis de secuencias de HASK.
ORF K2	vIL-6	Previene la apoptosis en células plasmáticas dependientes de IL6. Se une a la sub-unidad gp 130 del receptor de la IL6. Induce angiogénesis en fibroblastos de roedores. Se expresa sólo en poblaciones de células hematopoyéticas infectadas.
ORF K4	vMIP II	Se une a CCR3 e induce angiogénesis. Induce quimiotaxis de eosinófilos y respuesta Th2. Antagonista de CCR8 y vGCR.
ORF K4.1	vMIP III	Induce quimiotaxis Th2. Angiogénesis. Proteína expresada en lesiones de SK (por Western Blot).
ORF K6	vMIP I	Angiogénesis. Induce quimiotaxis Th2. Antagonista de CCR8.
ORF 16	vbcL-2	Inhibe apoptosis mediada por Bax.
ORF 50	ART	Transactivador que inicia la expresión de genes líticos.
ORF K8	b-ZIP	Transactivador lítico.
ORF K9	vIRF-1	Inhibe las señales del interferón y transforma fibroblastos de roedores.
ORF K10.5	LANA 2	Expresión latente en células B. Inhibe la apoptosis mediada por p53.
ORF K12	Kaposin	Transcripto nuclear poliadenilado expresado abundantemente en SK y LEP. Transforma fibroblastos de roedores.
ORF K13	vFLIP	Homólogo del inhibidor de la apoptosis celular FLICE.
ORF 72	vCYC	ARNm latente expresado en dependencia del ciclo celular. Fosforila y regula negativamente a p27.
ORF 73	LANA 1	Se une a ori-P y mantiene el episoma viral. Inhibe a p53 y a la proteína de retinoblastoma, RB1. Principal Antígeno latente nuclear empleado en las pruebas serológicas. Proteína expresada en todas las células infectadas con HASK.
ORF 74	vGCR	Homólogo a receptor de quimoquinas. Induce transformación y angiogénesis en fibroblastos de roedores. Señales a través de

la proteína G heterotrimérica. La señal es inhibida por el Interferón gamma.

ORFK15 **LAMP** Homología posicional y estructural a las proteína del VEB, LAMP1 y LAMP2A. Existen dos formas: Predominante (P) y Menor (M).

Abreviaturas: HASK herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi; ORF: marco de lectura abierta, del inglés *open reading frame*; ITAM: motivos de activación de inmunoreceptores de tirosina, del inglés, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*. ; SK: Sarcoma de Kaposi; vIL-6: interleuquina 6 viral; MIP: proteína inflamatoria de macrófago del inglés, *macrophage inflammatory protein*; vIRF: factor regulador del interferón viral, del inglés *interferon regulatory factor*; v-CYC: ciclina viral; vFLIP: inhibidor viral de la apoptosis; LANA: antígeno latente nuclear, del inglés *latent nuclear antigen*; GCR: proteína G acoplada al receptor, del inglés *G protein coupled receptor*; CCR3: receptor de quimoquinas; Th: células T cooperadoras, del inglés *T helper*; ARNm: ácido ribonucleico mensajero, LAMP: proteína de membrana latente, del inglés *latent membrana protein*, VEB: virus de Epstein-Barr.

II.3.3 Piratería Molecular de Genes Reguladores Celulares

La principal característica que distingue al VHH8 de otros virus tumorales es la presencia de gran cantidad de genes homólogos a genes reguladores del ciclo celular, conocidos como genes reguladores "piratas" (Moore y Chang, 1998; Osman y cols., 1999; Stine y cols., 2000). Sin embargo, en el VEB, se ha encontrado una correspondencia cercana entre los genes celulares inducidos por la infección por el VEB y los homólogos celulares codificados por el VHH8 (Moore y cols., 1996b; Sun y cols., 1999).

El avance en el conocimiento de las funciones de muchos de los genes del VHH8 hace de este virus un modelo para el estudio de virus tumorales. Otros virus modulan algunas de las mismas vías reguladoras, y todavía queda por dilucidar cuánto se puede extender este principio a virus tumorales no relacionados.

II.3.4 Replicación viral e Infección de las células

Similar a otros herpesvirus, el HASK tiene dos modos de replicación: lítico, en el cual el ADN viral es replicado por la polimerasa codificada por el virus y encapsidado en viriones infecciosos; y latente, en el cual episomas virales circulares se replican a la vez que el ADN de la célula huésped, usando la maquinaria de replicación celular (Moore y Chang, 2001). La iniciación de la replicación lítica resulta en muerte celular, principalmente por apoptosis (Yu y cols., 1999). No obstante la posibilidad de la producción viral continuada sin muerte celular no ha sido extensamente estudiada.

Los herpesvirus inician la replicación lítica a través de cascadas transcripcionales en las cuales un gen transactivador viral específico actúa como controlador para comenzar los pasos subsecuentes en la expresión de genes virales líticos (Jenner y cols., 2001). Una

vez que las proteínas transactivadoras son expresadas en respuesta a señales celulares; ellas por su parte, activan promotores de otros genes virales del VHH8 en la cascada de expresión lítica. Los genes virales necesarios para la replicación viral y encapsidación son activados secuencialmente ya sea directamente por el transactivador o secundariamente por reguladores transcripcionales en una serie de ondas de transcripción de genes virales inmediatos tempranos, tempranos y tardíos (Moore y Chang, 2001). No obstante, genes individuales del VHH8 pueden ser también regulados por vías de señales celulares tejido-específico (Moore y Chang, 2001). Por ello, algunos genes expresados durante la latencia en algunos tejidos pueden ser regulados y expresados primariamente durante la replicación lítica en otros tipos de células (Schwartz, 2004).

Existen dos genes del VHH8, el ORF K8 (Gruffat y cols., 1999) y el ORF 50 (Lukac y cols., 1998; Sun y cols., 1998) que codifican para las proteínas K-bZIP y ART (activadores de la replicación y de la transcripción respectivamente), que son candidatos para transactivadores líticos. Estas proteínas son homólogas a los transactivadores líticos Zta (ZEBRA) y Rta del VEB. Las relaciones entre estos transactivadores del VHH8 no están completamente claras aún. Sin embargo, algunos estudios indican que ART pudiera primero transactivar el gen ORF K8; mientras que la proteína K-bZIP subsecuentemente actuaría en otros promotores virales (Sun y cols., 1999). En este caso la expresión de ART sola es suficiente para iniciar todos los eventos que llevan a la replicación lítica. Los elementos de unión al ADN en los promotores de genes de respuesta al ART del VHH8 no han sido completamente caracterizados todavía.

Se han identificado dos sitios de origen de la replicación en el genoma del VHH8 mediante análisis de secuencia (Nicholas y cols., 1998). Similar a lo que ocurre para el VEB, la replicación lítica puede ser activada por agentes químicos, incluyendo el butirato y el forbol éster, *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA o PMA) (Miller y cols., 1997). El TPA activa la transcripción a través de la señal AP-1, mientras el butirato inhibe la histona deacetilasa incluida en la represión transcripcional. El TPA también induce la expresión de histona acetiltransferasa, sugiriendo que la des-represión de la transcripción de genes es un factor crítico en la iniciación de la replicación lítica (Masumi y cols., 1999). El ADN del VHH8 es empacado dentro de la partícula viral en el núcleo celular, y el virión

es envuelto en el aparato de Golgi o en la membrana celular plasmática tal como es exportada fuera de la célula (Figura 4).

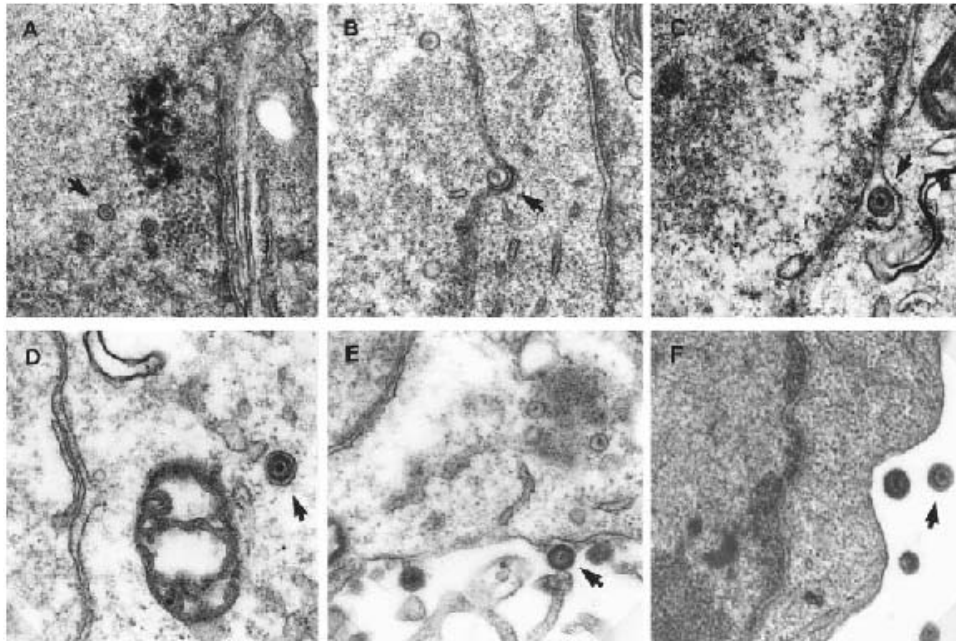


Figura 4. Maduración del virión en la línea celular BCBL-1 derivadas de LEP 48 horas después de la estimulación con TPA. **A:** nucleocápsidas formándose en el núcleo celular, **B:** cápsidas virales gemando a través de la membrana nuclear, **C:** virión en la cisterna perinuclear después del egreso del núcleo, **D:** virión encapsidado dentro de la vesícula citoplasmática, **E:** viriones completos gemando por la membrana celular, **F:** partículas libres en el espacio intercelular. (*Microscopía electrónica, magnificación 36000x*; Tomado del Fields, *Virology*, 2001).

Una vez que el virión entra a una nueva célula huésped, el genoma se circulariza en sus regiones terminales repetitivas para formar un episoma que se replicará junto a la célula durante el período de latencia. Los receptores de membrana que permiten la adhesión y entrada a la célula son desconocidos. El episoma es mantenido en la célula replicativa por el antígeno nuclear asociado a la latencia (LANA, del inglés; *Latency-associated nuclear antigen*) codificado por el ORF 73 (Ballestas y cols., 1999; Jenner y cols., 2001). LANA es similar a la proteína nuclear del VEB denominada EBNA1 (Yates y cols., 1984). El sitio por el que LANA se une al ADN viral, denominado origen de replicación del plásmido, (ori-P) no ha sido aún identificado pero se sugiere que pudiera estar ubicado en la terminales repetitivas (Ballestas y Kaye, 2001). Esto permite la segregación igualitaria de genomas latentes virales a las células hijas durante la mitosis. Durante la latencia, la expresión de genes es minimizada y el virus se apoya en la maquinaria de

replicación del ácido nucleico celular para sobrevivir (Moore y Chang, 2001). El silencio de los genes virales durante la latencia minimiza la presentación de antígenos extraños evadiendo así la respuesta inmune.

El reservorio primario de la infección persistente asintomática por el HASK parece ser el Linfocito B CD19+ (Ambroziak y cols., 1995). La infección natural del endotelio, las células B, y posiblemente células monocito-macrófago CD68+; el epitelio prostático y las raíces dorsales de los ganglios sensoriales también han sido reportadas (Ambroziak y cols., 1995; Blasig y cols., 1997; Diamond y cols., 1998). En la lesión de SK, virtualmente todas las células fusiformes tienen niveles detectables de ADN y proteínas virales (Boshoff y cols., 1995b; Staskus y cols., 1997; Dupin y cols., 1999) pero la mayoría de las células de la lesión se encuentran infectadas de manera latente por lo que no generan virus encapsidados (Orenstein y cols., 1997).

II.4 Radinivirus relacionados

Desde el descubrimiento del VHH8, la lista de los radinivirus de primates descubiertos se ha expandido rápidamente. El radinivirus de los *rhesus* (RVR), produce una infección común de los Macacos *rhesus*. El virus ha sido adecuadamente cultivado en células de riñón de mono así como el HVS (Desrosiers y cols., 1997). Fragmentos de ADN de otros dos radinivirus (RVR) asociados con fibromatosis retroperitoneal en Macacos *rhesus* (Rose y cols., 1997) y dos radinivirus de monos verdes africanos (Schulz y Moore, 1999) han sido aislados, pero estos no se han podido propagar *in vitro*. Estos descubrimientos sugieren que un progenitor primate del viejo mundo fue infectado con dos líneas separadas de radinivirus, los cuáles han ido subsecuentemente evolucionando junto con su huésped primate (Rose y cols., 1997; Schulz, 2000). Más recientemente se han identificado virus similares al VHH8 en chimpancés y gorilas (Greensill y cols., 2000; Lacoste y cols., 2000a). Una línea de primates, tiene relaciones genéticas y propiedades de cultivo *in vitro* similares al VHH8, mientras que la otra es similar al RVR. Debido a que no se ha encontrado una contraparte del RVR en humanos, se ha sugerido que debe existir al menos un radinivirus humano que todavía no ha sido descubierto ni caracterizado (Jung y cols., 1999; Schulz, 2000; Rickinson, 2001).

II.5 Historia Natural de la Infección por el HASK

No se han reportado síntomas clínicos característicos de la infección primaria por el HASK. La mayoría de las infecciones primarias son asintomáticas; un caso bien documentado de un paciente seropositivo al VIH desarrolló una linfadenopatía angiolinfoproliferativa acompañada por una elevación en los antígenos nucleares asociados a la latencia del VHH8, seguido por una elevación en el título de Acs frente a ORF 65 en suero (Oksenhendler y cols., 1998). La infección primaria genera una respuesta de Acs de tipo IgM e IgG frente a LANA y a Acs líticos. Los títulos de Acs IgM son transitorios, permaneciendo por algunos meses (Regamey y cols., 1998). La elevación en el título de Acs puede ser predictiva de enfermedad asociada al VHH8, y el patrón de seroreactividad frente a Acs específicos puede evolucionar durante el curso del SK (Goudsmit y cols., 2000).

El período de incubación para la enfermedad causada por el VHH8 es dependiente en primer lugar, del estado inmune de la persona infectada más que del tiempo de infectado con el VHH8. Los exámenes de pacientes transplantados que han recibido un órgano infectado nos ofrecen los estimados más precisos del período mínimo de incubación después de la infección, el que puede oscilar entre 13 y 27 meses después de la infección. (Regamey y cols., 1998). Entre los pacientes seropositivos al VIH el riesgo para desarrollar SK depende del conteo de CD4 más que de la carga viral de VIH (Renwick y cols., 1998; Moore y Chang, 2001), y la mitad de aquellos destinados a desarrollar SK se infectan entre 2 y 6 años antes del desarrollo de la enfermedad (Gao y cols., 1996b). Algunos pacientes, no obstante, pueden desarrollar la enfermedad clínica varios meses después de la infección primaria con el HASK. En estudios longitudinales se ha reportado que aquellos infectados primero con el VIH y luego con HASK desarrollarán SK asociado a SIDA más rápido que aquellos en que la infección ocurra de manera inversa (Renwick y cols., 1998).

El control inmunológico de la infección por el VHH8 en adultos sanos es evidente según diversos estudios clínicos (Schulz y cols., 2002; Hengge y cols., 2004). Se ha observado una respuesta frente a las proteínas codificadas por los genes ORFK1, ORFK8.1 y ORFK12 en linfocitos T citotóxicos restringidos a moléculas HLA (del inglés, *Histocompatibility Leucocyte Antigen*) clase I en pacientes infectados pero, esta

respuesta se pierde a medida que los pacientes progresan en el estado de inmunodeficiencia relacionado al SIDA (Moore y Chang, 2001).

II.6 Clasificación clínica-epidemiológica del Sarcoma de Kaposi

Contempla cuatro variantes (Figura 5) (Talbot y Whitby, 1999):

1. SK Clásico: predomina en el sexo masculino (relación hombre-mujer, 15:1), aparece entre los 50 y los 70 años de edad y tiene un curso crónico benigno en 10 a 15 años con una mortalidad del 20 % de los afectados; es frecuente en países de la zona del Mediterráneo.

2. SK Endémico: común en África Ecuatorial con una relación hombre-mujer similar al SK clásico, aparece entre los 25 y los 40 años pero se ven casos virulentos infantiles (Ziegler y Katongole, 1996). Entre ellos se destacan cuatro tipos:

a) Indolente o nodular: similar al clásico.

b) Florido: se presenta con tumores fungoides y exofíticos que invaden hasta el hueso.

c) Infiltrativo: agresivo localmente, afecta la piel en forma difusa, el tejido celular subcutáneo y hueso.

d) Linfadenopático: Casi exclusivo de ganglio y rápidamente fatal.

3. SK asociado a trasplante o latrogénico: tiene una frecuencia de 150-200 veces mayor que en la población general con una relación hombre-mujer de 2,3:1. Aparece, como promedio, 16 meses después del trasplante (Qunibi y cols., 1998). Un 30% de los casos mueren por la diseminación del SK. Mejora con las reducciones o los cambios de la terapia inmunosupresora. Se ha visto en inmunodeprimidos por terapia para enfermedades diversas (pénfigo, artritis reumatoide, entre otras).

4. SK Epidémico: fue una de las primeras afecciones reportadas al inicio de la epidemia de VIH/SIDA; constituye la manifestación inicial del SIDA en el 25 al 30% de los casos y se presenta durante el curso de la enfermedad, en el 35% de los pacientes. Se plantea que el 95% corresponde a HSH y sólo pequeños porcentajes a otros grupos de riesgo (Hengge y cols., 2002 y 2004).



Figura 5. Variantes clínica-epidemiológicas del Sarcoma de Kaposi. **A-** Clásico, **B-** Epidémico, **C-** latrogénico, **D-** Endémico. Tomado de *Lancet* 2002, 2:344-352.

A diferencia de la forma clásica del Kaposi, las lesiones en los pacientes con SIDA no tienen predilección por los miembros inferiores, sino que también se localizan en la parte superior del tronco, la cara, paladar, la conjuntiva, los ganglios linfáticos, pulmones y el tracto gastrointestinal. El compromiso sistémico lleva a la muerte, la cual es más probable si se asocia con una infección oportunista. El compromiso pleuropulmonar es el signo más ominoso (Talbot y Whitby 1999; Hengge y cols., 2002).

II.7 Características Anatomopatológicas

En este acápite solamente nos vamos a referir al SK epidémico o asociado a SIDA.

a) Características Macroscópicas (Lever y Schaumburg, 1983)

El SK epidémico puede manifestarse en cualquier área de la piel, las mucosas e inclusive afectar órganos internos. De esto se deriva la clasificación en:

- Sarcoma de Kaposi cutáneo.
- Sarcoma de Kaposi mucocutáneo.
- Sarcoma de Kaposi sistémico o visceral.

El SK cutáneo, antes de alcanzar la forma nodular o tumoral, puede manifestarse como máculas planas de color rosado o violáceo (parche) o ligeramente elevadas con fina descamación (placas). Las lesiones más frecuentes se localizan en la boca, el cuello, los muslos y la planta de los pies; puede acompañarse de inflamación y dolor (Ensoli y cols., 1999).

Las lesiones de SK de localización mucocutánea, se presentan como placas eritematosas o violáceas de aspecto infiltrativo, cuyo tamaño oscila entre unos milímetros hasta varios centímetros de diámetro, adoptando en ocasiones forma nodular (Hengge y cols., 2004).

Ocasionalmente puede involucrar órganos (SK sistémico o visceral), donde aparecen lesiones en forma de placas o nódulos con áreas hemorrágicas, que frecuentemente se asocian con los vasos sanguíneos. Se destaca la afinidad que tiene por las coronarias en el corazón y por los espacios porta, en el hígado. En los ganglios linfáticos se observan lesiones hemorrágicas que a veces por su tamaño pueden pasar inadvertidas (Lever y Schaumburg, 1983).

La afectación del tracto gastrointestinal puede causar hemorragias digestivas, enteropatías o cuadros obstructivos, aunque habitualmente, el paciente suele estar asintomático (Hengge y cols., 2002).

En el aparato respiratorio afecta la pleura, se extiende por los septos alveolares del pulmón y tiene preferencia por las áreas peribronquiales (Figura 6). La forma difusa pulmonar puede acompañarse de una hemorragia masiva que suele ser la causa inmediata de la muerte (Hengge y cols., 2002).



Figura 6. Sarcoma de Kaposi Epidémico con afectación pulmonar. *Tomado de Lancet 2002, 2:344-352.*

En la tráquea y en los grandes bronquios la localización es submucosa, como también lo es en el tubo digestivo, donde con frecuencia, por su crecimiento exuberante se produce ulceración de la mucosa que recubre la lesión nodular, lo que puede plantear problemas de diagnóstico diferencial (Hengge y cols., 2004).

b) Características Microscópicas (Lever y Schaumburg, 1983)

Las características microscópicas son similares para cualquier variante clínica-epidemiológica.

El tumor se acompaña de una reacción inflamatoria linfoplasmocitaria que es muy variable. Casi siempre más desarrollada en las formas iniciales del SK, las que a su vez tienden a mostrar un predominio del aspecto angiomatoso.

Histológicamente, las lesiones de SK pueden presentarse en un inicio como una enfermedad inflamatoria inespecífica de la piel, que es seguida posteriormente por una variante en la que predominan células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos donde abundan las células fusiformes, lo que le confiere un aspecto tumoral sarcomatoso con células fusiformes conteniendo espacios vasculares.

Lever en 1983 plantearon diferentes estadios de la enfermedad desde el punto de vista histológico: Estadios inflamatorios y proliferativos que se consideran estadios tempranos de la enfermedad, los que se observan macroscópicamente como placas y parches, respectivamente. Estos van seguidos por el estadio tumoral, el cual se puede presentar

clínicamente como nódulos o con un carácter sarcomatoso tumoral en la fase agresiva tardía del SK (Lever y Schaumburg, 1983).

Los estadíos tempranos se asemejan al tejido de granulación; los vasos sanguíneos en la dermis están dilatados y aumentados en número. Se observa infiltrado perivascular y celular difuso compuesto de células linfoides, plasmáticas e histiocitos. Existen vasos de neoformación en las células endoteliales y frecuentemente se ven pequeños grupos de eritrocitos y depósitos de hemosiderina, por ello, en estadíos tempranos no es siempre posible llegar a un diagnóstico. No obstante, la presencia de células endoteliales grandes que protruyen hacia la luz, la extravasación de eritrocitos y la presencia de hemosiderina en un tejido de granulación indica la posibilidad de SK inicial.

Un componente característico es la presencia de glóbulos eosinofílicos de aspecto hialínico, que se localizan con preferencia en el interior del citoplasma, aunque pueden observarse en el espacio extracelular. Su tamaño es variable, pero inferior al de los hematíes, entre sus propiedades tintoriales se destacan que son PAS positivas, diastasa resistente y se tiñen de rojo brillante con floxina-tartracina y de azul oscuro con hematoxilina fosfotúngstica. Las formaciones hialinas son de gran utilidad para el diagnóstico diferencial aunque pueden faltar.

En los estadíos tempranos de parche, se encuentran espacios vasculares con paredes finas y dilatadas. Frecuentemente, ellos no contienen eritrocitos en la luz, por lo tanto sugieren corresponder con estructuras linfáticas. Las células endoteliales que rodean estos espacios no tienen apariencia atípica y por ello se diferencian del angiosarcoma (Ackerman, 1979).

En las lesiones en placas y nodulares, se pueden presentar agregados de vasos sanguíneos que muestran proliferación de células en huso periféricas a la capa de células endoteliales. El estroma, en el cual los vasos están embebidos, usualmente contiene eritrocitos extravasados y depósitos de hemosiderina. Existen además agregados sólidos de células endoteliales, alguna de las cuales contienen células elongadas, por lo que a veces se hace imposible determinar si ellas son células endoteliales u otras células fusiformes. Además de mostrar proliferación neoplásica de los vasos sanguíneos, las lesiones en placas y nodulares pudieran mostrar proliferaciones en los canales linfáticos (Tedeschi, 1958).

En las formaciones de células fusiformes se observan proliferaciones extensas de células con forma de huso que se distribuyen en bandas y se extienden en diferentes direcciones, así como la presencia de espacios entre las células que contienen eritrocitos (Figura 7) (Lever y Schaumburg, 1983).

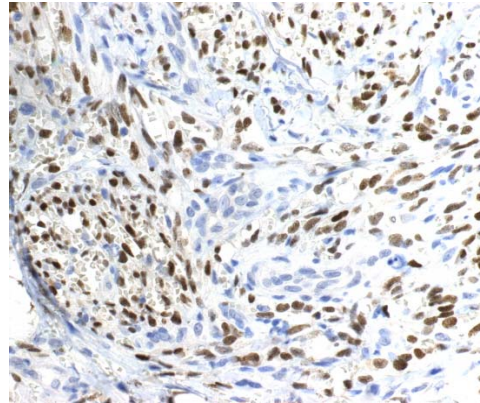


Figura 7. Hallazgos histológicos en el Sarcoma de Kaposi. Células fusiformes que con frecuencia se ordenan en espacios vasculares, extravasación de hematíes y presencia de pigmentos hemosiderínicos. *Tomado de J Natl Cancer Inst Monographs 1998 ;23:79-88.*

II.8 Patogenia de los trastornos linfoproliferativos relacionados al HASK

Las tres enfermedades neoplásicas relacionadas a la infección con el HASK (SK, LEP y una forma de la EC) representan un espectro de desórdenes proliferativos que van desde una hiperplasia policlonal hasta una neoplasia monoclonal. Es por ello que el HASK nos brinda una idea de la patología de la proliferación celular y sus relaciones con la vigilancia inmunológica (Lacoste y cols., 2000b; Schulz, 2000).

Todas las formas de proliferación celular se consideran tumores, pero la hiperplasia ocurre a través de la replicación normal de células policlonales operando a través de mecanismos regulados por citoquinas (Moore y Chang, 2001). La proliferación neoplásica implica disregulación autónoma de la expansión celular por células anormales que han sido transformadas (Aoki y Tosato, 2004). Los cánceres prototípicos son agresivos y monoclonales, y raramente regresan espontáneamente (Judde y cols., 2000). Esto no implica que los desórdenes neoplásicos sean independientes de citoquinas, y de

hecho las neoplasias muestran una fuerte dependencia autocrina y paracrina. Los cánceres inducidos por virus, no obstante, pueden resultar de múltiples células infectadas independientemente que producen una expansión clonal que asemeja más un desorden de tipo policlonal que monoclonal (Lacoste y cols., 2000b; Moore y Chang, 2001).

El SK es un tumor vascular compuesto de células proliferativas en forma de huso que se piensa sean derivadas de una línea endotelial, posiblemente del endotelio linfático (Dictor, 1997; Dupin y cols., 1999; Hengge y cols., 2004). El mismo, frecuentemente contiene células normales, ya sea por el crecimiento infiltrativo o por reclutamiento inflamatorio celular. Algunos estudios sugieren que el SK tiene un origen celular monoclonal como las otras neoplasias (Rabkin y cols., 1995 y 1997), mientras que otros autores indican que es una hiperplasia policlonal (Delabesse y cols., 1997; Hengge y cols., 2004). Estas diferencias, en parte pueden deberse a la mezcla de células normales y tumorales, pero también pudiera ser posible que el tumor se origine como una enfermedad policlonal u oligoclonal que posteriormente evolucione a un desorden monoclonal cuando algunos clones logran una ventaja de crecimiento (Gallo, 1998; Judde y cols., 2000).

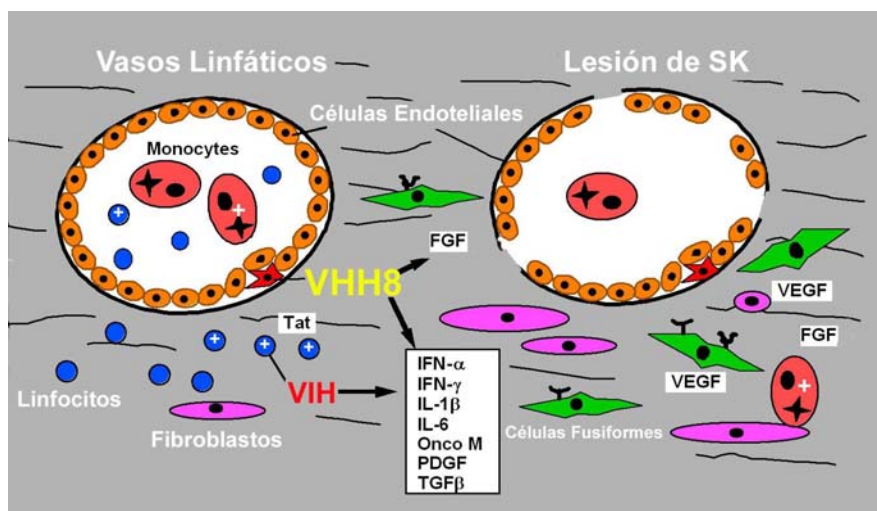


Figura 8. Representación esquemática de la patogénesis del Sarcoma de Kaposi. Tomado de *Am J Cancer* 2004;3:133-149. Abreviaturas: IFN: interferón, IL: interleuquina, OncoM, oncostatina M, FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, (del inglés *fibroblast growth factor*), PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, (del inglés *platelet-derived growth factor*), VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*), Tat: proteína transactivadora del VIH, TGF: factor transformador del crecimiento, (del inglés *transforming growth factor*), VIH: virus de la inmunodeficiencia humana, SK: Sarcoma de Kaposi, VHH8: virus del herpes humano 8.

Un aspecto importante de la patogenia es si la proliferación de las células fusiformes, características de este tumor, ocurre debido a la activación de productos génicos virales o por citoquinas inflamatorias estimuladas por la infección viral (Figura 8).

Se ha propuesto que algunas células endoteliales infectadas con el VHH8, así como monocitos y linfocitos, eventualmente producirán células endoteliales atípicas. Estas pueden ser transformadas al ser expuestas a un microambiente particular, resultando en una población de células policlonales con morfología de células fusiformes las cuales portan receptores para factores de crecimiento que contribuirán a los daños endoteliales (Hengge y cols., 2004).

Una hipótesis alternativa plantea que una lesión precursora no infectada existe primero, la cuál secundariamente atrae células infectadas por el virus a través de citoquinas inflamatorias (Ensolli y Sturzl, 1998; Sturzl y cols., 1999). En este caso la infección con el HASK es una consecuencia y no la causa de la enfermedad. Estas conclusiones se basan en el estudio de lesiones tempranas de SK (estadio de parche), donde solo una minoría de células tumorales se han encontrado infectadas, aunque la posibilidad de insensibilidad de la detección viral no se ha excluido. Es difícil conciliar esta hipótesis con los estudios epidemiológicos, los que indican que la infección precede el inicio de la enfermedad clínica hasta en 10 años (Whitby y cols., 1995; Gao y cols., 1996b; Martin y cols., 1998; Schulz, 2000).

La liberación de citoquinas inflamatorias como el IFN gamma así como de citoquinas vasoproliferativas, induce la replicación lítica del VHH8 (Monini y cols., 1999). Las citoquinas celulares, como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, siglas del inglés *fibroblast growth factor*), se piensa que son importantes en el mantenimiento de las células tumorales (Ensolli y cols., 1999), pero existen debates acerca de si las citoquinas inflamatorias inducen las lesiones de SK o si se encuentran involucradas secundariamente como respuesta inflamatoria a la infección viral en el SK. La proteína *tat* del VIH ha sido también implicada como un mediador central en la patogenia del SK asociado a SIDA (Ensolli y cols., 1991; Hofman y cols., 1993; Ensolli y cols., 1994; Hengge y cols., 2004).

En contraste con el SK, los LEP tienen características clínicas, inmunofenotípicas y moleculares que representan un proceso neoplásico típico. Estos linfomas de células B ocurren como efusiones malignas en cavidades viscerales, aunque las células malignas pueden ser encontradas infiltrando órganos viscerales adyacentes así como en la circulación periférica (Boshoff y cols., 1998). En el escenario del SIDA, el curso clínico de la mayoría de estos linfomas es extremadamente agresivo, con una supervivencia media después del diagnóstico de 5 a 7 meses ([Nador](#) y cols., 1996). La implementación de terapia antirretroviral en los pacientes ha resultado en regresión, lo que es atípico para un linfoma ([Hengge](#) y cols., 2004).

Las células del LEP, a diferencia de las de SK están completamente transformadas y son tumorigénicas en ratones inmunodeficientes (Picchio y cols., 1997; Boshoff y cols., 1998). Se ha propuesto que el HASK podría jugar algún papel en otros linfomas relacionados al SIDA, como los linfomas del Sistema Nervioso Central (SNC), pero no se han demostrado con certeza estos planteamientos (Cesaman y cols., 1995b; Gaidano y cols., 1997; Aoki y Tosato, 2004).

La EC es una linfadenopatía reactiva caracterizada por centros germinales expandidos y proliferación de los vasos endoteliales dentro de los ganglios linfáticos involucrados. Basado en los hallazgos microscópicos, la EC puede ser dividida en dos subtipos histológicos: vascular hialino y variante celular plasmática. La primera se presenta habitualmente como una lesión solitaria, mediastinal, que puede ser tratada curativamente mediante escisión quirúrgica, mientras que la variante celular plasmática tiende a tener una presentación multicéntrica y maligna. A pesar de que la EC es considerada no neoplásica, ésta frecuentemente precede el desarrollo de linfomas no-Hodgkin (Peterson y Frizzera, 1993).

La disregulación en la producción de IL-6 es la anomalía principal que dirige las características clínicas e histológicas de la EC (Brandt y cols., 1990). La IL-6 inhibe la apoptosis de células B mediante inducción de Bcl-XL ([Schwarze y](#) Hawley, 1995), reduciendo el recambio de las células B. La IL-6 es también un factor de crecimiento autocrino para algunas neoplasias de células B ([Akira](#) y Kishimoto, 1992). Las formas de la EC relacionadas al HASK parecen ser causadas por secreción de IL-6 viral ([Moore](#) y

Chang, 2001), mientras que las EC negativas a infección por el HASK resultan probablemente de hipersecreción celular local de IL-6 a través de otros mecanismos. La mayoría de los tumores de EC en pacientes con SIDA presentan niveles detectables de infección por el HASK, mientras que solo se detecta en la mitad de pacientes seronegativos al VIH con este tumor ([Soulier](#) y cols., 1995). La EC relacionada a infección por el VHH8 es generalmente la variante plasmocítica ([Schulz](#), 2000) y es clínicamente severa; la mayoría de los pacientes mueren en dos años por una variedad de trastornos, incluyendo anemia hemolítica autoinmune (Parravicini y cols., 1997a).

Las células B infectadas con el VHH8 están presentes de manera dispersa en los centros germinales de tumores de la EC positivos a HASK (Parravicini y cols., 1997a). Estas células expresan un amplio rango de proteínas virales, incluyendo productos de genes líticos tempranos (Parravicini y cols., 2000). No se ha determinado aún si este pequeño porcentaje de células infectadas en los centros germinales son neoplásicas por sí mismas, pero se ha encontrado expansión monoclonal de células B en algunos casos de EC (Hanson y cols., 1988, Hall y cols., 1989).

II.9 Pruebas diagnósticas

Los intentos por cultivar el VHH8 directamente a partir de células tumorales infectadas de lesiones de SK no han sido exitosos (Mesri y cols., 1996; Foreman y cols., 1997; Renne y cols., 1998). Explantos de células fusiformes de SK mantienen virus detectable mediante PCR por 2 a 6 pases, después de lo cual el virus invariablemente se pierde del cultivo (Flamand y cols., 1996). En contraste, el HASK puede ser cultivado exitosamente *in vitro* a partir de las células B de LEP y de células de sangre periférica de pacientes con LEP (que contienen de 50 a 150 copias genómicas por células) (Cesarman y cols., 1995b, Arvanitakis y cols., 1996; Boshoff y cols., 1998; Drexler y cols., 1998) y con el tratamiento de líneas celulares con agentes químicos se puede inducir ciclo lítico de replicación (Wang y cols., 1998; Yu y cols., 1999).

La transmisión directa de tumores de SK y líneas celulares de LEP a células 293 demuestra que el virus derivado de tumor es completamente permisible para la infección; sin embargo, los niveles de virus que se logran son bajos (Foreman y cols., 1997; Renne y cols., 1998). Los problemas que aparecen con la transmisión del virus parecen ser debidos a la carencia de una línea celular receptora adecuada más que a la inhabilidad de generar virus infeccioso. Sin embargo, se han probado docenas de líneas celulares y todas han fallado al intentar identificar células apropiadas para estudios de transmisión (Renne y cols., 1998). Recientemente, Moses y colaboradores han descrito infecciones a largo plazo y transmisiones con altos títulos (Moses y cols., 1999). Esto ha sido logrado usando células endoteliales de capilares de la dermis inmortalizadas con los genes E6 y E7 de Papilomavirus. La infección con el HASK transforma las células endoteliales inmortalizadas de Papiloma, las que crecen en agar blando y pierden la inhibición por contacto. Lo mismo ocurre con la expresión de algunos genes del VHH8, sugiriendo que los genes expresados de manera latente son suficientes para complementar a E6 y E7 en la transformación. La confirmación de estos resultados pudiera conducir a análisis más sofisticados de la genética del HASK, asumiendo que los virus delecionados pueden ser generados y transmitidos.

El ADN del HASK puede ser detectado en células de sangre periférica en alrededor de la mitad de las personas infectadas usando técnicas de PCR cualitativos para detectar

infección pasada o actual con el virus (Whitby y cols., 1995; Moore y cols., 1996b; Dupin y cols., 1997). Sin embargo, recientemente se han empleado técnicas cuantitativas como el PCR en Tiempo Real (Taq man), con el cual se ha podido detectar un mayor porcentaje de positividad (Polstra y cols., 2003).

Las pruebas serológicas para la detección específica de Acs son más sensibles que el PCR cualitativo para detectar tanto infección actual o pasada con el virus (Gao y cols., 1996a; Dupin y cols., 1997). Se han producido mejoras en estos sistemas diagnósticos rápidamente, y en estos momentos, bajo condiciones óptimas, se puede detectar infección viral hasta en un 90% de los individuos infectados (Schulz, 2000; de San José y cols., 2002).

La respuesta de Acs frente a LANA y otros antígenos del HASK al parecer persisten toda la vida en adultos saludables. Sin embargo, en pacientes con SK en estadio final del SIDA puede evidenciarse la pérdida de Acs en un 10 a un 30% de los casos (Moore y Chang, 2001).

Existen al menos cinco sistemas serológicos en uso actualmente, cada uno con sus ventajas y desventajas. La prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar Acs frente a LANA o frente a antígenos líticos es relativamente barata y simple pero su interpretación puede ser subjetiva. LANA fue el primer Ag serológico identificado mediante IFI (Moore y cols., 1996c) y la IFI para la detección de Acs anti-LANA es, aún hoy en día, considerada una prueba estándar debido al bajo nivel de reacciones falsas positivas; es una prueba con alto nivel de especificidad, pero menos sensible que la detección de Acs frente a Acs líticos ya que detecta Acs en alrededor del 80% de casos con SK (Moore y cols., 1996c; Moore y Chang, 2001).

Las pruebas serológicas para detectar Acs empleando Acs líticos tienen un porcentaje de sensibilidad más elevado (más de un 95%), pero también tienen el riesgo de reactividad cruzada, especialmente a diluciones bajas del suero por lo que pueden aparecer reacciones falsas positivas. La reactividad cruzada es la explicación para los elevados porcentajes de infección reportados inicialmente para los ensayos usando Acs líticos comparados con los de Acs latentes (Lennette y cols., 1996). Se ha desarrollado un

ELISA con el virión completo purificado que tiene características similares que la IFI empleando Ags líticos. (Chatlynne y cols., 1998).

Los Ags recombinantes de *ORF 65* y *ORF K8.1A* usados en ELISA muestran sensibilidad y especificidad comparable a la técnica IFI empleando Ags Líticos (Lin y cols., 1997; Chandran y cols., 1998).

Las evidencias serológicas sugieren que diferentes poblaciones de individuos tienen respuestas heterogéneas de Acs frente a antígenos del VHH8; por ello, la combinación de pruebas con diferentes Ags es la que permitiría la obtención de resultados más confiables (Moore y Chang, 2001). Actualmente, cuando se realizan las técnicas adecuadamente con los formatos ya estandarizados los resultados son altamente concordantes. Estos resultados deben ser mejorados con el uso de Ags recombinantes, pero las conclusiones basadas en los primeros estudios empleando la técnica de IFI anti-LANA han sido confirmadas usando las preparaciones de Ags más refinadas (Schulz, 1998).

II.9.1 PCR en Tiempo Real

El descubrimiento del PCR en tiempo Real ha sido posible debido a dos hallazgos importantes. Primero, que la Taq polimerasa, además de su actividad de polimerasa tiene actividad 5'-3'exonucleasa (Holland y cols., 1991). Segundo, que se han creado oligonucleótidos fluorogénicos doblemente marcados los cuáles emiten la señal fluorescente sólo cuando son clivados, basados en el principio de transferencia de energía por resonancia fluorescente (Cardullo y cols., 1988). En el Taq Man, estos dos principios han sido combinados. En este sistema, se diseña una sonda (Taq Man probe) la cual hibrida con la secuencia blanco, entre los clásicos oligonucleótidos con sentidos positivo y negativo. La sonda está doblemente marcada, con un fluorocromo reportador (del inglés *reporter*) (ej: 6-carboxifluoresceína, o FAM) en un extremo y un colorante apagador (del inglés *quencher*) (Ej: 6-carboxi-tetrametil-rodamina, o TAMRA) en el extremo 3'. En la forma inactiva, la emisión fluorescente del marcador "reporter" será absorbida por el marcador "quencher" (Giulietti y cols., 2001).

La sonda tiene una temperatura de hibridación de aproximadamente 10°C por encima que la de los oligonucleótidos, con el objetivo de hibridar con el amplicón durante la fase

de extensión del proceso del PCR (la que se realiza a 60°C), consecuentemente, la sonda será degradada durante la fase de extensión por la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa. Esto resultará en un incremento en la emisión fluorescente del "reporter" (Giulietti y cols., 2001). La cantidad de fluorescencia liberada será directamente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo de PCR y por ello puede ser aplicado como una medida cuantitativa de la formación del producto de PCR (Overbergh y cols., 2001).

Todos los sistemas realizan la reacción de PCR en un tubo cerrado y miden la acumulación del producto en tiempo real durante el curso de la amplificación de PCR. Existen diferencias entre los formatos de aplicación de las muestras (tubos, microplacas, tiras de tubos, capilares, etc.), entre el número de muestras a testar (desde 16 hasta 384), el tiempo que demora una corrida (desde 30 minutos a 2 horas). Como el uso de esta tecnología se ha hecho más frecuente, se han desarrollado otros productos químicos más sofisticados para medir directamente la acumulación del producto de PCR por emisión fluorescente, ejemplos incluyen los beacons moleculares, escorpiones y sondas de hibridación entre otros, en dependencia de las aplicaciones específicas a ser realizadas (Eurogentec, 2002).

Todos los sistemas incluyen un programa que permite medir el incremento en la emisión de fluorescencia en tiempo real, durante el curso de la reacción. Este incremento está directamente relacionado al incremento en la amplificación de la secuencia blanco (Overbergh y cols., 2001).

Los valores de emisión fluorescente del producto son ubicados en una gráfica frente al número de ciclos, resultando en puntos de amplificación para cada muestra. Los valores umbrales de fluorescencia (CT, siglas del inglés *cycle threshold*) son entonces determinados como el número del ciclo en que la emisión fluorescente excede un umbral seleccionado previamente y que usualmente se determina como 10 veces la desviación estándar del valor basal. Un programa ploteará los valores desconocidos de las muestras sobre la curva estándar construida para determinar el número de copias de la muestra desconocida. Alternativamente, los valores de CT pueden ser usados directamente como medidas cuantitativas (Giulietti y cols., 2001).

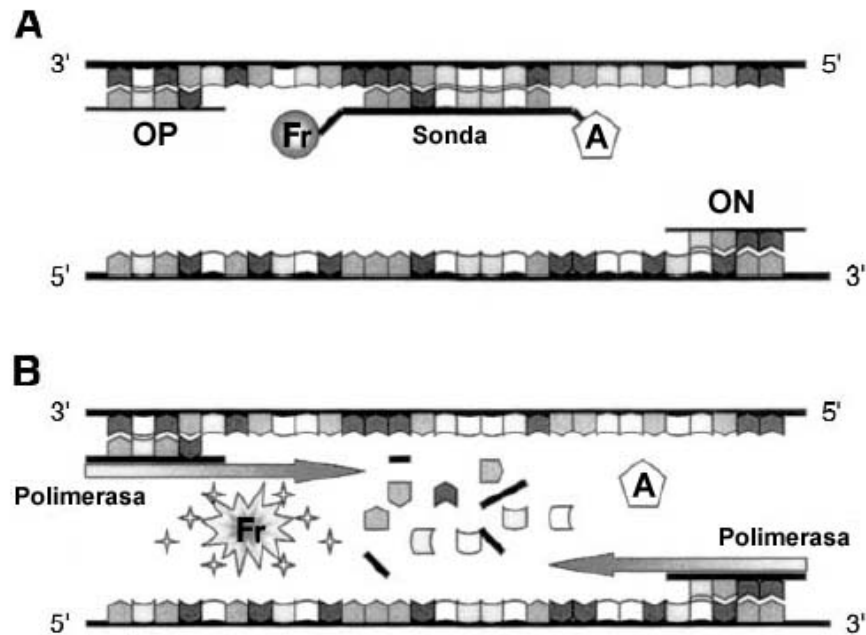


Figura 9. Representación esquemática del principio del PCR en tiempo Real (Taq Man). **A:** los oligonucleótidos y la sonda hibridan con el gen blanco. La emisión de fluorescencia no ocurre porque la sonda se encuentra aún intacta. **B:** Durante la fase de extensión del PCR, la sonda es clivada por la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, permitiendo que ocurra la emisión fluorescente. *Tomado de Methods 2001;25:386-401.*

Abreviaturas Fr: fluorocromo reportador; A: apagador; OP: oligonucleótido positivo; ON: oligonucleótido negativo

II.10 Epidemiología.

II.10.1 Distribución del SK en el mundo

La existencia de un agente infeccioso causante del SK se sospechó debido al comportamiento epidemiológico inusual del tumor (Giraldo y cols., 1972; Beral y cols., 1990). Antes de la Epidemia del SIDA, el SK clásico tenía un patrón específico, ocurriendo con mayor frecuencia en hombres ancianos con origen mediterráneo o de Europa del Este (Iscovich y cols., 1998). Una de las evidencias indicativas de la presencia de un algún otro factor (Ej. Virus) en esta enfermedad fue la diferencia en los porcentos de SK entre diferentes áreas geográficas (Talbot y Whitby, 1999).

Existe una diferencia de más de 100 veces en la prevalencia de SK clásico entre diferentes países de Europa. Inglaterra presenta valores tan bajos como 0.14 casos por

millón de habitantes, mientras que en Sardinia y Sicilia se han alcanzado valores de hasta 24 a 30 casos por millón de habitantes por año (Moore y Chang, 2001). Los Estados Unidos tienen una prevalencia intermedia de 3 y 0.7 casos por millón en hombres y mujeres, respectivamente (Iscoyich y cols., 2000). Aún más, se han detectado altos porcentos en poblaciones de África Central (SK Endémico), donde existe una forma particularmente maligna que afecta fundamentalmente a los niños (Cook y Burkitt, 1971; Athale y cols., 1995; Ziegler y Katongole, 1996). La ocurrencia de SK se ve también incrementada entre los receptores de transplantes y pacientes que reciben quimioterapia, particularmente cuando pertenecen a grupos étnicos de alto riesgo (Penn, 1979 y 1988; Qunibi y cols., 1988).

Independientemente del país, los porcentos de incidencia de SK se han incrementado dramáticamente con la aparición del SIDA desde principios de la década del 80. Las evidencias de un agente infeccioso involucrado en la etiología del SK se hizo más fuerte con los estudios epidemiológicos de pacientes con SIDA, debido a que los factores de riesgo conductual apuntaban hacia un agente sexualmente transmisible (Beral y cols., 1991). Los HSH con SIDA son 20 veces más propensos a desarrollar SK que pacientes con SIDA heterosexuales masculinos, inmunosuprimidos y hemofílicos (Beral y cols., 1990). Los estudios también sugieren que el agente se diseminó internacionalmente desde los EU hacia las comunidades homosexuales en Canadá y Europa (Beral y cols., 1991; Melbye y cols., 1998; Schulz, 2000). El hecho de mantener relaciones sexuales con hombres bisexuales constituye también un factor de riesgo para el desarrollo de SK entre las mujeres infectadas con VIH. En contraste, las personas infectadas con VIH a través de transfusiones sanguíneas, raramente desarrollarán SK, indicando que el agente causal del SIDA y del SK no son igualmente transmisibles a través de la sangre (Moore y Chang, 2001).

A pesar de que al principio el VIH fue considerado como un posible candidato para agente etiológico del SK, no se encontraba explicación para aquellos casos con SK seronegativos al VIH ni para los bajos porcentajes de SK en pacientes hemofílicos y en receptores de transfusiones de sangre, infectados con el VIH (Schwartz, 2004).

II.10.2 Prevalencia del VHH8 en diferentes poblaciones

La detección del ADN del VHH8 mediante el uso del PCR ha permitido determinar la presencia del virus tanto en personas seronegativas al VIH (clásico, endémico, relacionado a inmunosupresión) como en pacientes con SK y SIDA.

Más de 20 estudios independientes han demostrado la presencia de ADN viral mediante PCR en al menos el 95% de los tumores de pacientes con SK (Schulz, 1998; Schulz y Moore, 1999; Moore y Chang, 2001). Pudiera ser posible que un pequeño porcentaje de lesiones de SK se encuentren libres de infección por el HASK, pero actualmente se asume que el virus deberá siempre ser detectado en muestras que sean adecuadamente colectadas, conservadas y procesadas. Los beneficios del PCR como técnica simple y altamente sensible para detectar la infección, se deben balancear con la gran susceptibilidad que tiene el mismo a la contaminación con amplicones, ya que algunos de los estudios iniciales que mostraron resultados epidemiológicos anómalos, se debían a contaminaciones del PCR no detectadas (Boshoff y cols., 1996).

Los estudios serológicos también soportan los hallazgos casi universales de infección por el VHH8 en pacientes con SK, debido a que se han detectado Acs específicos al virus entre un 70 y un 90% de todos los pacientes con SK, y en casi el 100% de los pacientes con SK que no están inmunosuprimidos. (Gao y cols., 1996 a y b; Moore y cols., 1996b y c; Simpson y cols., 1996; Kedes y cols., 1997; [Chatlynne](#) y cols., 1998; Pierrotti y cols., 2005).

A diferencia de la mayoría de los otros herpesvirus, el HASK no es ubicuo sino que se encuentra restringido de acuerdo a la combinación de factores geográficos y de factores de riesgo conductuales (Perna y cols., 2000; Moore y Chang, 2001; Schulz y cols., 2002; Ziegler y cols., 2003). Los porcentos de infección con el VHH8 generalmente coinciden con la incidencia de SK en diferentes partes del mundo. El SK es inusual en los EU, y la seroprevalencia de HASK entre donantes de sangre en EU varía entre un 0 y un 10%, mientras que en muchas poblaciones africanas existen niveles de seroprevalencia superiores al 50% (Gao y cols., 1996b; Ariyoshi y cols., 1998; Gessain y cols., 1999; Plancoulaine y cols., 2004; Stein y cols., 2004). Porcientos intermedios de prevalencia se han detectado en donantes de sangre en Italia (Gao y cols., 1996b; Rezza y cols., 1998;

Whitby y cols., 1998) y otros países Mediterráneos donde el SK es más común (Qunibi y cols., 1998).

Dos estudios han demostrado un gradiente de seroprevalencia al VHH8 a lo largo de la península Itálica donde se relacionan con los porcentos locales de ocurrencia de SK. Los niveles más altos de infección y enfermedad son encontrados en el Sur de Italia, particularmente en Sardinia, y los niveles más bajos se han reportado en el Norte de Italia (Calabro y cols., 1998; Whitby y cols., 1998; Smacchia y cols., 2004). En Japón, donde la seroprevalencia de HASK puede ser tan baja como 0.2% (Fuji y cols., 1999), el SK es un tumor muy raro. Un hallazgo que hasta el momento no ha tenido explicación es el hecho de que los porcentos de infección por el VHH8 son elevados en Africa Occidental, y sin embargo el SK no es común en esta área (Ariyoshi y cols., 1998; Cook-Mozaffari y cols., 1998).

Datos como estos sugieren que otros factores aún no descritos, como pudieran ser el haplotipo u otros cofactores infecciosos juegan un papel en la expresión de la enfermedad en personas infectadas con HASK (Mann y cols., 1990).

La seroprevalencia de HASK en poblaciones de alto riesgo es dramáticamente más elevada que en la población general (Dukers y cols., 2000). Los HSH pueden tener una infección asintomática en alrededor del 40% (Miller y cols., 1996; [Martin](#) y cols., 1998) y el SK es más frecuente entre homosexuales seronegativos al VIH que entre la población masculina general (Friedman-Kien y cols., 1990; Moore y Chang, 2001). Varios estudios muestran un declinar en las nuevas infecciones por el VHH8, en correspondencia con la disminución en la incidencia de SK entre los pacientes con SIDA que se ha venido observando en los últimos años en los países desarrollados (Dore y cols., 1996; Melbye y cols., 1998; Renwick y cols., 1998). Las razones para este declinar no son claras, pero una posible explicación es que el VHH8 tiene una baja infectividad, y con la implementación de prácticas de sexo seguro se reduce la transmisión en poblaciones de alto riesgo ([Martin](#) y cols., 1998).

La comprensión actual de la epidemiología del HASK ayuda a explicar el misterio que ha existido durante mucho tiempo con relación al por qué el SK se convirtió en el marcador clínico del SIDA durante el comienzo de la epidemia. Es posible que la

epidemia inicial de SIDA y SK resultara de la colisión entre dos epidemia virales simultáneas e independientes, VIH y HASK (O'Brien y cols., 1999; Moore y Chang, 2001). Por ello, no resulta sorprendente que los HSH, quienes presentan un riesgo elevado independientemente para el VIH y el VHH8 en comparación con los hombres heterosexuales, comprendan la mayoría de los pacientes con SK y SIDA.

En muchos países desarrollados, las mujeres constituyen solo del 10 al 30% de los casos con SK, comparado con los hombres (Grulich y cols., 1992; Hjalgrim y cols., 1996). Acorde a los estudios serológicos realizados por Goedert y colaboradores., Kedes y colaboradores, y Whitby y colaboradores, la prevalencia de infección al VHH8 también es menor en las mujeres que los hombres, en los EU y en países de Europa del Norte ([Goedert](#) y cols.,1997; [Kedes](#) y cols.,1997; Whitby y cols., 1999). Los porcentos más elevados de infección ocurren entre las mujeres que se atienden en clínicas de enfermedades de transmisión sexual, brindando una evidencia de que el virus también puede ser transmitido heterosexualmente, pero este modo es probablemente mucho menos eficiente que la transmisión homosexual ([Kedes](#) y cols., 1997; Smith y cols., 1999). En las poblaciones del Mediterráneo y África no se observan diferencias significativas en los porcentos de infección entre los sexos ([Bourboullia](#) y cols., 1998; Olsen y cols., 1998; Whitby y cols., 1998; Sitas y cols., 1999a; Plancoulaine y cols., 2004), y parece existir una influencia hormonal en la expresión de la enfermedad debido a que el SK, aún en poblaciones sin VIH, se detecta más frecuentemente en hombres que en mujeres en estas regiones ([Geddes](#) y cols., 1994; Iscovich y cols., 1998). Tanto la infección como la enfermedad son extremadamente raras en niños de EU y Europa, mientras que es más común en algunas partes de África ([Blauvelt](#) y cols., 1997; Mayama y cols., 1998).

Los estudios epidemiológicos sugieren que solo una pequeña parte de los adultos asintomáticos infectados con el VHH8 desarrollarán la enfermedad, por ello el SK es un tumor raro en países con bajos porcentos de infección. La enfermedad sintomática ocurre principalmente entre personas con una inmunosupresión adquirida (para las personas negativas al VIH, esto puede deberse a edad avanzada o terapia inmunosupresora), resultando en la disminución de la respuesta de la inmunidad mediada por células frente a Ags virales específicos ([Osman](#) y cols., 1999).

En contraste, la prevalencia de VHH8 era ya alta en algunos países de África antes de la introducción del VIH (Olsen y cols., 1998). Debido a la epidemia del VIH en África, la prevalencia de SK tumoral se ha elevado dramáticamente, y en estos momentos es considerado el cáncer reportado con mayor frecuencia en algunos países del continente, alcanzando hasta el 50% dentro de los tumores reportados entre los hombres adultos (Bassett y cols., 1995; Aoki y Tosato, 2004).

II.10.3 Transmisión

El conocimiento detallado de la transmisión del HASK se encuentra incompleto actualmente, por ello existe mucha especulación sobre cómo ocurre la infección con el virus. Estudios seroepidemiológicos sugieren que el VHH8 tiene al menos dos modos principales de transmisión. La transmisión sexual es la forma más común en países desarrollados con bajos niveles de prevalencia, donde la infección es poco común. En contraste, predominan las rutas de transmisión no sexual en las regiones endémicas de África donde los porcentos de infección son elevados (Moore y Chang, 2001; Schulz y cols., 2002). Las razones para estas diferencias, así como los mecanismos precisos de transmisión humano-humano, no son conocidos. De manera similar, se desconoce si las rutas de transmisión sexual o no sexual son las principales vías de infección en los países del Mediterráneo.

El HASK puede excretarse en semen (Blackbourn y Levy, 1997) y por ello pudiera ser transmitido durante las relaciones sexuales vaginales o rectales. La prevalencia de VHH8 se incrementa con el número de contactos homosexuales masculinos ([Martin](#) y cols., 1998), y se ha encontrado que ser receptor de sexo anal se considera un factor de riesgo en algunos estudios ([Melbye](#) y cols., 1998). No obstante, el virus se ha podido detectar en muestras de semen de una minoría de las personas infectadas, sugiriendo la posibilidad de que la excreción viral sea intermitente o que sólo un pequeño porcentaje de hombres tengan niveles elevados de virus en semen (Blackbourn y Levy, 1997). La excreción del VHH8 en el tracto genital de las mujeres infectadas es infrecuente y su significado en la transmisión mujer-hombre se desconoce, pero probablemente sea baja ([Whitby](#) y cols., 1999).

Los viriones infecciosos del HASK se han detectado también en la saliva de individuos seropositivos al VHH8, lo que sugiere la replicación del virus en la orofaringe ([Koelle](#) y cols., 1997; [Pauk](#) y cols., 2000; [Taylor](#) y cols., 2004). Sin embargo, se desconoce por qué si el HASK es transmitido a través de las secreciones orales, el virus mantiene un patrón de transmisión sexual más que por contacto oral (Ej: besos) ([Pauk](#) y cols., 2000). Prácticas sexuales específicas como son el contacto oroanal y orogenital pudieran ayudar a explicar esto ([Grulich](#) y cols., 1999; [Hengge](#) y cols., 2004).

Se conoce aún menos acerca de cómo el HASK es adquirido de manera no sexual en países de África, donde la infección puede ocurrir durante la niñez ([Kasolo](#) y cols., 1997; [Olsen](#) y cols., 1998; [Sitas](#) y cols., 1999b). Contrario a lo que ocurre en los países desarrollados, la transmisión madre-hijo puede ser una de las vías de infección con el VHH8 en áreas altamente endémicas ([Mayama](#) y cols., 1998; [Lyal](#) y cols., 1999; [Sitas](#) y cols., 1999b). Las infecciones con el HASK continúan ocurriendo a lo largo de toda la niñez y la adolescencia en las regiones endémicas, lo que ha sido demostrado por la detección de Acs al VHH8 en diferentes grupos de edades ([Mayama](#) y cols., 1998; [Andreoni](#) y cols., 1999) argumentando la transmisión del virus a través de alguna forma de contacto casual.

La transmisión del VHH8 relacionada a trasplantes es una importante causa prevenible de SK. La enfermedad puede resultar tanto por la reactivación viral después del trasplante como por la infección primaria a partir del órgano transplantado. ([Parravicini](#) y cols., 1997b). El SK puede ser una complicación de cualquier forma de trasplante, ya sea de médula ósea, cardíaco, renal, u otros. El mismo se desarrolla en el 0.1 al 1 % de los receptores de trasplante en países con baja endemicidad ([Moore](#) y [Chang](#), 2001) y en casi el 5% de pacientes de Arabia Saudita, donde la infección por el HASK es alta ([Qunibi](#) y cols., 1998). El riesgo de desarrollar SK es significativo para pacientes receptores de trasplante. [Farge](#) y cols. en 1999 demostraron que el 68% de los pacientes infectados con el virus desarrollaron tumores durante el seguimiento ([Farge](#) y cols., 1999). Se ha descrito recientemente, un nuevo síndrome de fallo de la medula ósea después del trasplante, el cual se ha asociado a infección por el HASK ([Luppi](#) y cols., 2000). En contraste al trasplante de órganos, la transmisión a partir de productos de la

sangre es infrecuente. La prevalencia de SK es baja entre los pacientes con SIDA infectados a través de las transfusiones de sangre, argumentando el bajo porcentaje de transmisión mediante esta ruta (Cannon y cols., 2001).

II.11 Origen y Evolución del VHH8

El origen del VHH8 y el modo en que el mismo haya entrado en la población humana son preguntas científicas que están siendo exploradas activamente. Las comparaciones de genes conservados entre los herpesvirus sugieren que la línea HHV8-RVR se separó del HVS de manera correspondiente a la separación entre los monos del viejo y el nuevo mundo (Moore y cols., 1996b; McGeoch y Davison, 1999). El examen filogenético de genes homólogos permite hacer un análisis evolutivo único debido a que tanto los genes virales como los del huésped pueden ser comparados directamente. Por ejemplo, el gen de la interleuquina 6 viral (vIL-6) está presente en el VHH8 y en el RVR, pero no en el HVS, y el análisis de las secuencias nucleotídicas (nt) y aminoacídicas apoya la noción de que los virus ancestrales VHH8-RVR capturaron este gen después de la separación entre los monos del viejo y del nuevo mundo (McGeoch y Davison, 1999).

Los estudios de filogenia y de epidemiología molecular de los aislamientos del VHH8 han sido difíciles debido a que la secuencia nt tiende a ser altamente conservada (Russo y cols., 1996). Las secuencias del VHH8 de las líneas celulares de LEP (BC-1, BC-3 y BCBL) y de lesiones de SK, demuestran que la región central del genoma tiene menos de un 0.4% de variación nt entre estos dos aislamientos (Neipel y cols., 1997). Existen regiones de alta variabilidad en las regiones internas repetitivas, donde se pueden ganar o perder repeticiones (Gao y cols., 1999). No obstante, existe una alta variación de secuencias en los extremos derechos e izquierdos de la región única larga adyacente a las secuencias terminales repetitivas. A pesar de estas regiones de variabilidad, la integridad general del genoma del VHH8 parece ser alta, y no se han encontrado asociaciones claras entre los diferentes genotipos y las variantes clínicas de SK (Zong y cols., 1999).

Basadas en las diferencias de secuencias en el extremo derecho del genoma (gen ORFK15), pueden ser distinguidas al menos dos variantes principales del VHH8. Las

dos variantes se denominan P (predominante) y M (menor) (Poole y cols., 1999). El gen K15 codifica para una proteína de membrana asociada a la latencia, la cual es variable entre los aislamientos, manteniendo sólo un 30% de homología entre ellos (Glenn y cols., 1999; Kakoola y cols., 2001). Los aislamientos P y M son encontrados entre grupos o subtipos ampliamente dispersos del VHH8 y no siguen "clusters" filogenéticos. La variante P es la más frecuente entre los genomas de VHH8 caracterizados hasta ahora, e incluye los 5 principales genotipos del gen ORFK1 (Poole y cols., 1999); la variante M es rara y ha sido encontrada en algunos pocos genotipos A, B y C (Lacoste y cols., 2000c).

En el extremo izquierdo del genoma se localiza el gen ORF K1, el cual ha mostrado ser altamente variable. Se ha observado hasta el 85 y 60% de divergencia a nivel nt y aa, respectivamente (Schulz y cols., 2002). ORF K1 codifica una proteína de transmembrana altamente glicosilada de 289 aa con una estructura similar a las familias de proteínas receptoras de inmunoglobulinas (Figura 10). Estudios de predicción de la proteína K1, sugieren que la misma tiene una señal de secuencia peptídica en la región amino terminal, un dominio extracelular, un dominio hidrofóbico de transmembrana, y un extremo citoplasmático corto en la región carboxi-terminal (Lagunoff y cols., 1997; Lee y cols., 1998).

El dominio extracelular de K1 tiene homología regional con la familia de las Inmunoglobulinas; contiene regiones conservadas (RC1 y RC2), las cuales tienen hasta un 15% de divergencia, y regiones variables (RV1 y RV2) que muestran aproximadamente 60% de divergencia a nivel aminoacídico, siendo frecuentes las sustituciones aminoacídicas sinónimas y no sinónimas (Zong y cols., 1999). El dominio citoplasmático de K1 contiene un motivo de activación de inmunoreceptor compuesto de tirosina, conocido como ITAM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), el cual se encuentra completamente conservado en las más de 300 secuencias del gen ORF K1 reportadas hasta ahora (Lee y cols., 1998; Zong y cols., 1999; Lee y cols., 2003). La hipermutabilidad en el ectodominio de K1 probablemente refleje la presión inmunológica ejercida en las células infectadas que expresan esta proteína. Las secuencias virales de diferentes pacientes tienen generalmente diferentes secuencias del

gen ORF K1, mientras que muestras del mismo paciente tomadas en diferentes momentos o localizadas en sitios anatómicos diferentes tienen secuencias idénticas (Zong y cols., 1999 y 2002; Luppi y cols., 2000).

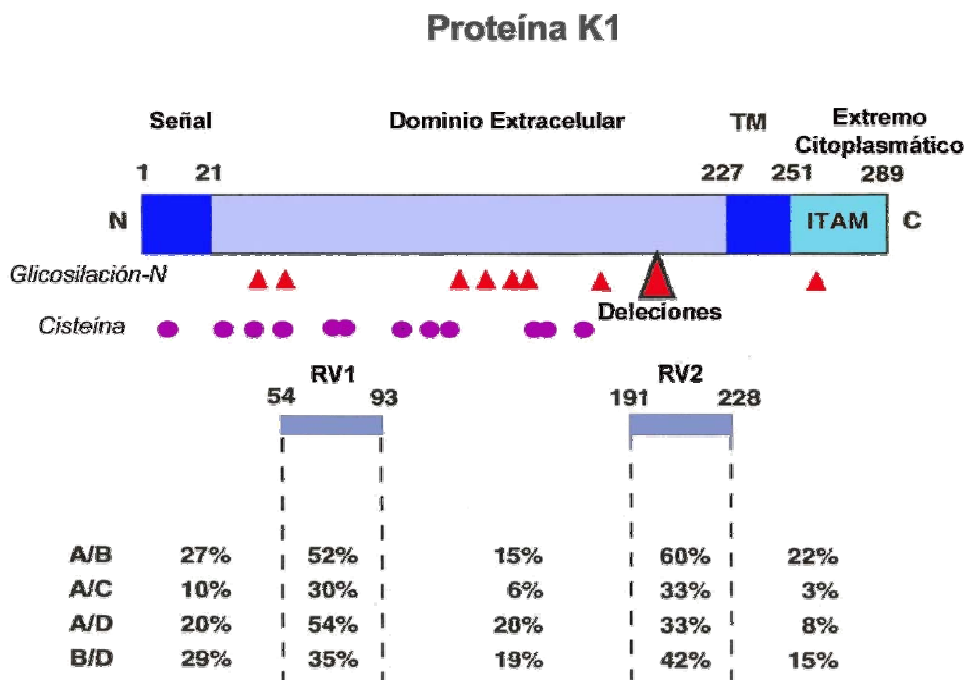


Figura 10. Estructura de la proteína K1 del Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi (HASK). El diagrama indica los dominios de señal peptídica y de transmembrana propuestos, y las posiciones de los residuos de cisteína conservados y los sitios de glicosilación NxS/T en el dominio extracelular así como en el motivo de activación de inmunoreceptor compuesto de tirosina ITAM en el extremo C-terminal. El porcentaje total de diferencias aminoacídicas entre los principales genotipos A, B, C y D son indicadas para las dos regiones variables predominantes (RV1 y RV2) y las regiones más conservadas en el medio y en ambos extremos de la proteína. Tomado de *J Natl Cancer Inst Monographs* 1998 ;23:79-88.

Basados en la variabilidad del gen ORFK1, se ha demostrado la existencia de cuatro genotipos (A, B, C, D) los cuales parecen estar relacionados geográficamente. Así, el genotipo B predomina en África y está más distante de los grupos A y C encontrados en Europa y EU (Kakoola y cols., 2001). Por otra parte, el genotipo D está solo restringido a habitantes de las islas del Pacífico (Meng y cols., 1999; Zong y cols., 1999). Un quinto genotipo E, relacionado con el D, ha sido encontrado en poblaciones de Amerindios de Brasil y Ecuador (Biggar y cols., 2000; Whitby y cols., 2004). Hasta el momento sólo se han publicado pocos estudios en relación a este gen, principalmente en EU, Italia, Grecia, Rusia y África (Cook y cols., 1999; Zong y cols., 1999; Kadyrova y cols., 2003). A partir de

estos hallazgos se ha sugerido que el VHH8 se introdujo en las poblaciones humanas antes de las migraciones fuera de África, hace 100 000 años, por lo que es considerado un patógeno humano relativamente antiguo (Figura 11).



Figura 11. Hipótesis sobre la migración del Virus del Herpes Humano 8 en la antigüedad, del mismo modo que lo hicieron las poblaciones humanas. Desde África hacia Europa, Asia y Pacífico, y finalmente a América.

Por otra parte, se ha planteado una alternativa sobre el origen del VHH8, basada en la presencia de secuencias nts conservadas entre los diferentes radinovirus y en el elevado porcentaje de infección en países adyacentes a África Central, la misma plantea la transmisión zoonótica del VHH8 en las poblaciones humanas a partir de los monos durante el paso de miles de años (Zong y cols., 2002), diseminándose lentamente en áreas vecinas. Las variaciones extremas en el gen ORF K1 pudieran reflejar adaptaciones recientes del VHH8 a un nuevo huésped (McGeoch y Davison, 1999). En cualquier caso, la comprensión de la diseminación y evolución del VHH8 requiere tomar en cuenta su reciente diseminación intercontinental antes y durante la epidemia de SIDA (Archibald y cols., 1990; Melbye y cols., 1998).

II.12 Tratamiento

No hay cura para el SK epidémico, y los tratamientos empleados no se asocian con prolongación de la supervivencia, no obstante, pueden mejorar la calidad de vida de los

pacientes y disminuir la sintomatología. También es importante tener en cuenta que la mejoría cosmética favorece el estado psicológico de los pacientes (Hengge y cols., 2004).

El tratamiento varía en dependencia de que la enfermedad se circunscriba o no a la piel y de la extensión de la lesión. Siempre se debe mantener, mientras sea posible, el tratamiento antirretroviral de alta potencia que incluya un inhibidor de proteasa (Murphy y cols., 1997). Se ha reportado una dramática resolución de ambos el SK y el LEP con el uso de terapia antirretroviral contra el VIH en pacientes con SIDA, y esto ocurre también para los pacientes con SK postransplante cuando se les suprime la terapéutica inmunosupresora (Wincelhaus, 1998; Hengge y cols., 2004). Estos hallazgos son alentadores ya que indican que podría lograrse una vacuna terapéutica para el control de las enfermedades relacionadas al VHH8.

En aquellos pacientes en los cuales la enfermedad sea mínima o estable, o de leve progresión, la opción de tratamiento podría ser solo la observación por un período de tiempo.

Los tratamientos del SK se dividen en dos categorías: locales y sistémicos.

II.12.1 Tratamientos locales

Se ha empleado con eficacia la radiación en pacientes con lesiones únicas o con un grupo de lesiones localizadas; las inyecciones quimioterapéuticas en las lesiones utilizando Vinblastina (Velban) diluida, sodio de teradecila (Sotradeal) e interferón alfa (IFN- α) han resultado efectivas (Brodreaux y cols., 1993). La crioterapia también ha resultado exitosa en lesiones de la cara y áreas genitales; así como la cirugía en lesiones que causan problemas estéticos, el láser en lesiones endobronquiales y la escleroterapia con tetradenil-sulfato de sodio en lesiones orales nodulares. Se recogen en la literatura el uso de dinitroclorobenceno tópico y el factor de necrosis tumoral intralesional (Hengge y cols., 2004).

II.12.2 Tratamientos sistémicos

Se recomienda el tratamiento sistémico si el SK está diseminado, es de progresión rápida o está localizado en más de un órgano, pero esta forma de tratamiento tiene efectos secundarios tóxicos que afectan las células del sistema inmunológico por lo que se debe evaluar el binomio riesgo-beneficio. La Vincristina (Oncovin) y la Vinblastina son

activos contra el SK epidémico, el etopósido (VP-16), aunque no se emplea como medicamento de primera línea, se usa por vía oral (Brodreaux y cols., 1993). La Doxorubicina (Adriamycin) es útil en personas que no hayan reaccionado a otros medicamentos o en aquellos con enfermedad avanzada; la triple combinación de Doxorubicina, Bleomicina y Vincristina (ABV) es de mayor eficacia. En 1995 se aprobó una nueva formulación de doxorubicina llamada Doxil (Doxorubicina liposomal). Este fármaco está encapsulado en liposomas que permiten una mayor absorción por las células tumorales y tiene menos efectos tóxicos. Recientemente, se aprobó el uso del primer derivado liposomal de la Daunorubicina (Dauno Xome) para el tratamiento del SK epidémico avanzado (Osoba y cols., 2001). El empleo del IFN-alfa solo o en combinación con la terapia antirretroviral ha demostrado un beneficio significativo como tratamiento (Tossing, 2001). La terapia fotodinámica, la cual involucra la exposición a la luz ultravioleta después de la ingestión de hematoporfirina (Fotofrin), ha proporcionado resultados cosméticos desfavorables debido al desarrollo de cicatrices e hiperpigmentación (Hengge y cols., 2004).

II.12.3 Tratamientos experimentales

Los derivados del ácido retinoico, se encuentran actualmente en ensayos clínicos fase I/II y fase II/III, donde se emplean el ácido cisretinoico (oral y tópico) y la tretinoína (Retín A). Un derivado de la corteza de los árboles de tejo, el Paclitaxel, ha ocasionado una respuesta favorable en el 59% entre pacientes con SK epidémico avanzado (Hengge y cols., 2004). Las globulinas inmunes intravenosas, compuestos angiostáticos (Tecogalan), la apolipoproteína E, la terapia hormonal con b-HCG, beta-LH y, posiblemente, los inhibidores del receptor glucocorticoide, también se encuentran en estudio; los inhibidores del factor de crecimiento y de la angiogénesis (IL-6 y la Oncostatina), inhibidores de las telomerasas también ofrecen resultados prometedores (Stemlich y Bergers, 2000).

Se han hecho algunos ensayos *in vitro* que demuestran la susceptibilidad del VHH8 frente algunos antivirales como son el cidofovir, ganciclovir, adefovir y foscarnet, mientras que parecen ser resistentes al aciclovir y penciclovir (Little y cols., 1998; Robles y cols., 1999).

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1- Seroprevalencia de Acs en diferentes grupos de población cubana sexualmente activa

III.1.1 Poblaciones estudiadas y muestreo

El laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) del departamento de virología del IPK cuenta con una seroteca donde se almacenan a -20° C todos los sueros de pacientes seropositivos al VIH que han sido enviados al laboratorio desde el año 1991 para determinar la presencia de Acs frente al VHS, Citomegalovirus (CMV), y VEB. Esta investigación se realiza de rutina a todos los pacientes seropositivos al VIH cuando se diagnostican con esta infección y durante la evolución de la misma. Esto hace que se cuente con varios sueros de un mismo paciente.

Se estudiaron 433 muestras de sueros divididas en 5 grupos de individuos, con bajo y alto riesgo de infección con el VHH8. El primer grupo estuvo constituido por 45 pacientes con SK asociado a SIDA diagnosticados clínicamente y confirmados por el departamento de anatomía patológica del IPK durante los años 1991 al 2003 de acuerdo a los criterios estándares (Titus y Kim, 1990). De éstos, ocho casos se diagnosticaron en la autopsia, sin presentar signos clínicos de la enfermedad. Los sueros de pacientes con SK empleados en el estudio fueron seleccionadas de la seroteca, tomando en cuenta el año en que fueron diagnosticados con SK o el suero mas cercano a la muerte del paciente para los pacientes diagnosticados postmortem, mientras que a los pacientes vivos se les tomó un suero inmediatamente después del diagnóstico de SK, previo consentimiento informado (ver Anexo V).

En el segundo grupo se incluyeron 154 pacientes seropositivos al VIH sin evidencia clínica de SK, 35 de los cuáles estaban clasificados en estadio SIDA, de acuerdo a los criterios de clasificación del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta en 1993 (CDC, 1992). Los sueros de estos pacientes fueron seleccionados de la seroteca del laboratorio (incluyendo los años 1991 al 2003) mediante muestreo aleatorio simple. Ninguno de los casos incluidos en este grupo estaban reportados como parejas sexuales de pacientes con SK en el Registro Nacional de VIH del MINSAP.

El tercero de los cinco grupos estuvo integrado por 171 donantes de sangre seronegativos al VIH provenientes del banco de sangre de la Provincia de Pinar del Río, los cuáles además fueron negativos para Ag de superficie del virus de la Hepatitis B y negativos de Acs frente a hepatitis C y VDRL. En el cuarto grupo se incluyeron 27 pacientes receptores de trasplante renal, los cuáles también eran seronegativos para el VIH. Los sueros de ambos grupos fueron recogidos durante el año 1998.

El quinto grupo estuvo constituido por 36 contactos de pacientes con SK. Como criterio de inclusión en esta categoría se consideró a aquellas personas que habían convivido o eran parejas sexuales del paciente con SK por un período mayor a un año. Algunos individuos fueron seleccionados a partir del Registro Nacional de VIH del MINSAP por personal autorizado, mientras que otros asistieron voluntariamente para participar en el estudio (ver acápite **III.4.1**). Treinta y cuatro de los 36 individuos eran contactos sexuales de pacientes con SK y seropositivos al VIH, mientras que dos fueron contactos familiares, seronegativos al VIH. Las muestras fueron recogidas durante los años 1998 al 2000 y 2004.

Los grupos 1, 2 y 5 son considerados de alto riesgo para infección por el VHH8, mientras que los grupos 3 y 4 son considerados de bajo riesgo, de acuerdo a reportes previos de prevalencia en diferentes grupos poblacionales (Gao y cols., 1996a; Perna y cols., 2000; Moore y Chang, 2001).

III.1.2 Determinación de anticuerpos en suero

Las muestras de suero fueron codificadas al inicio del estudio, por lo que el estatus serológico frente al HASK se determinó a ciegas. Todos los sueros se habían conservado a -20°C, con la excepción de los sueros más antiguos que podían haber sufrido algunas descongelaciones. La detección de Acs frente a los Ags LANA se realizó mediante IFI empleando una línea celular linfocítica derivada de LEP denominada BCP-1, que se encuentra infectada de manera latente con el VHH8, la misma fue donada por los Dres Patrick Moore y Yuan Chang de la universidad de Columbia en EU. Dicha línea celular utiliza RPMI 1640 (GIBCO, EU) con 20% de suero de ternera fetal como medio de mantenimiento. Tanto para la preparación de las láminas como para la técnica de IFI se siguió el protocolo descrito por Gao y colaboradores en 1996 y Martin y

colaboradores en 1998. Las células BCP-1 fueron pasadas cada dos a tres días e incubadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ hasta lograr que las mismas se encontraran en fase de crecimiento exponencial; en este momento fueron centrifugadas a 2000xg por 20 minutos a 37°C, el sedimento celular obtenido se resuspendió y lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7.3 mediante centrifugaciones a 2000xg por 10 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron contadas y ajustadas a una concentración de 6x10⁵ células /mL, la suspensión de celular fue goteada en láminas de inmunofluorescencia (50 µL/pozo). Una vez que las láminas se secaron por calor a 37°C, las mismas se fijaron con metanol durante 15 minutos a 4°C y se guardaron a -70°C hasta que fueran a ser utilizadas. Las muestras de suero se diluyeron 1:160 con albúmina bovina (BSA) al 3% diluída en PBS, con el objetivo de eliminar reacciones falsas positivas. Antes de gotear los sueros, las láminas fueron bloqueadas con BSA al 3% durante 30 minutos con el fin de eliminar la fluorescencia de fondo. Posteriormente, se lavaron las mismas cinco veces con PBS-Tween 20 por tres minutos cada lavado. Se añadieron 20 µL de los sueros de los pacientes y se incubaron las láminas por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, se lavaron nuevamente con PBS de la misma forma que se describió anteriormente y luego se añadieron 20 µL de IgG e IgM anti-humanos desarrollados en carneros y conjugados con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA, EU), diluidos 1:100 y 1:50, respectivamente en azul de Evans. Luego de 30 minutos de incubación a 37°C, se realizaron nuevamente los lavados y se procedió a la lectura en microscopio de fluorescencia (Leica, Alemania) con magnificación 20x y 40x (Gao y cols., 1996a; Martin y cols., 1998).

Las muestras se consideraron positivas si aparecía un patrón de tinción en forma de punteado nuclear que es específico para el VHH8. Cada muestra se estudió por duplicado, y en los casos discordantes se hizo un tercer ensayo.

Los controles positivos y negativos empleados en nuestro ensayo fueron donados por el Dr. Patrick Moore de la Universidad de Columbia en EU, y consistían en casos que habían resultado repetidamente positivos y negativos, respectivamente, al diseñar el ensayo de IFI anti-LANA (Gao y cols., 1996a).

III.1.3 Análisis estadístico

Se recogieron los datos demográficos, epidemiológicos y clínicos de los pacientes seropositivos al VIH seleccionados para el estudio a través del Registro Nacional de VIH del MINSAP.

Se usaron los métodos de estadística descriptiva (porcentajes). La comparación de frecuencias se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado y la prueba de Fisher se empleó para determinar la diferencia de proporciones.

III.2- Detección de ADN del VHH8 en tejido y saliva de pacientes con SK

III.2.1 Muestras empleadas

Se estudiaron 72 muestras de tejidos (52 embebidos en parafina y 20 tejidos frescos) provenientes de biopsias de lesiones de piel o autopsias de pacientes cubanos con diagnóstico clínico y/o histológico de SK epidémico, diagnosticados en el período comprendido entre los años 1991- 2004 en el Departamento de Anatomía Patológica del IPK.

Tabla 2. Patrones histológicos de las lesiones de piel de pacientes seronegativos al VIH sin Sarcoma de Kaposi que se utilizaron en el estudio. 1998.

Tipo histológico de lesión	Número de casos	Sexo
Dermatitis superficial vascular	1	F
Dermatitis folicular	1	F
Dermatitis subaguda con pústulas corneales	1	M
Granuloma Histiocítico con células gigantes	1	M
Carcinoma celular escamoso invasivo	2	M
Vasculitis linfoplasmocitaria superficial	3	M
Carcinoma de células basales superficiales	1	F

Fuente: Informe Anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica. IPK.

Se estudiaron además, 10 muestras de tejido también embebidas en parafina de pacientes seronegativos al VIH que presentaban otras lesiones en piel, diagnosticados en el año 1998 (Tabla 2). Por otra parte, se estudiaron 22 muestras de saliva

correspondientes a pacientes diagnosticados con SK epidémico que se encontraban vivos en el momento del estudio.

III.2.2 Extracción de ADN y PCR

Para los tejidos de lesiones de SK embebidos en parafina, los cortes de tejidos de 15-20 micras fueron desparafinados adicionando 1 mL de Xilol repetidamente (3 a 4 repeticiones) e incubando las muestras a temperatura ambiente a intervalos de 30 minutos, seguidos de centrifugaciones a 10000xg, según protocolo descrito en el manual " PCR Protocols" (Volkenandt y cols., 1993). Una vez eliminada la parafina, el tejido se hidrató y se lavó sucesivamente con 1 mL de etanol al 100 y al 75%; luego se centrifugó a 10000xg durante 15 minutos a 4°C para eliminar el etanol. El tejido sedimentado, se resuspendió entonces en 200 µL de tampón lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10% SDS) y 10µL de proteinasa K (25mg/mL, SIGMA, EU) y se incubó a 56°C hasta lograr la lisis total del mismo. Posteriormente, se hizo la extracción con 200 µL de fenol-cloroformo y se precipitó el ADN en 1 mL de etanol absoluto a -70°C por 1 hora seguido de dos lavados con 1mL de etanol al 75%; el ADN genómico (ADNg) finalmente extraído fue resuspendido en 50 µL de H₂O bidestilada. En el caso de los tejidos frescos de lesiones de SK y de las muestras de saliva, no se hizo el tratamiento con Xilol; sólo la extracción a partir del tampón lisis. Para valorar la calidad y concentración del ADNg obtenido, 1µL del ADN de cada muestra fue corrido en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio.

Cinco microlitros del ADNg y 1µL de cada producto de amplificación fueron empleados para la primera y la segunda reacción de amplificación respectivamente. Las muestras fueron colocadas en 50 µL de mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH9.0, 4mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP y 10 picomoles de cada mezcla de oligonucleótidos (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos empleados en la primera y la segunda reacción de amplificación.

Virus	Positivo 1	Negativo 1
	Primera reacción	
VPR	5' CGTGGCATCTACGGGGACACGGA 3'	5' ATGACGCCGATGTACTTCTTCT 3'
VHH7	5' CGCATCATCTACGGGGACACGGA 3'	5' ATGACGCCGATGTACTTTTTCTT 3'
VHH8	5' AAGGTTATATATGGAGATACGGA 3'	5' ATTACCCCAATGTACTTTTTCTT 3'
CMV	5' CGGGTCATCTACGGGGACACGGA 3'	5' ACTTTGCCGATGTAACGTTTCTT 3'
VHH6	5' GAGGTAATTTATGGTGATACGGA 3'	5' TGTCTACCAATGTATCTTTTTTTT 3'
VEB	5' CGAGTCATCTACGGGGACACGGA 3'	5' AGCACCCCCACATATCTCTTCTT3'
Segunda reacción		
	Positivo 2	Negativo 2
VPR	5' GGGACACGGACTCGGTCTTC 3'	5' CCGGAAGGTCTTCTCGCACTC 3'
VHH7	5' GTGTTGTGCCGCGTCTCAC 3'	5' GGTGAACGTCTTTTCGAACTC 3'
VHH8	5' TGAGGGGATAGCTAAAATCG 3'	5' TATAAAAAGTTTTTCACACTC 3'
CMV	5' GGGCCCAGCCTGGCGCACTA 3'	5' GACGAAGACCTTTTCAAACTC 3'
VHH6	5' GCCAAACATATCACAGATCG 3'	5' ACATAAAATCTTTTCAAACTC 3'
VEB	5' ACCCGGAGCCTGTTGTAGC 3'	5' GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC 3'

Fuente: *J Virol Methods* 1999,79:9-19.

Se realizó una PCR anidada múltiple que permite detectar en un solo tubo de reacción la presencia de Virus del herpes humano 7 (VHH7), Virus del herpes humano 8 (VHH8), CMV, Virus del herpes humano 6 (VHH6) y VEB, siguiendo el protocolo desarrollado por el Dr. Francisco Pozo del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda, Madrid (Pozo y Tenorio, 1999). Para la primera reacción se utilizaron dos mezclas de oligonucleótidos de zonas conservadas dentro del genoma de los herpesvirus (gen de la ADN polimerasa viral), lo cual genera un producto de 194 pares de bases (pb). En la segunda reacción de amplificación se utilizó una mezcla de oligonucleótidos de otra zona conservada (negativa 2) y una segunda mezcla de oligonucleótidos no homólogos y tipo específicos seleccionados a partir de zonas variables dentro de este gen para los diferentes herpesvirus (positivo 2), generándose productos de diferentes tallas para cada herpesvirus. Por otra parte, para garantizar el funcionamiento del PCR, se incluyó en la primera reacción de amplificación, el ADN (100 copias/ μ L) del virus de la pseudorrabia porcina (VPR), como control interno de cada reacción de amplificación, así como los juegos de oligonucleótidos específicos en ambas reacciones de amplificación (Figura 12).

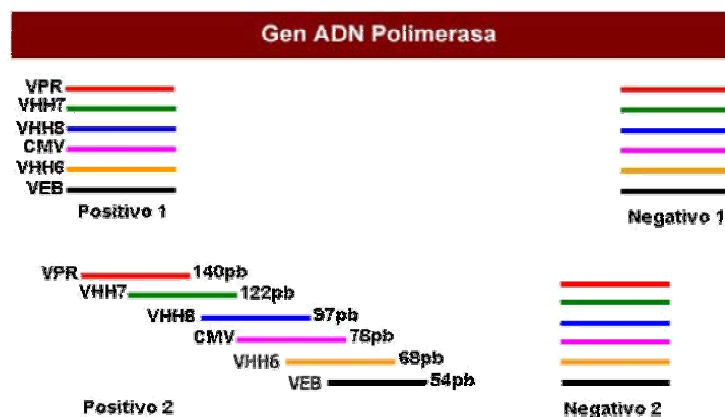


Figura 12. Representación esquemática de los juegos de oligonucleótidos empleados en el PCR anidado múltiple.

Abreviaturas: **VPR**: Virus de la pseudorrabia porcina, **VHH7**: Virus del herpes humano 7, **VHH8**: Virus del herpes humano 8, **CMV**: Citomegalovirus, **VHH6**: Virus del herpes humano 6 y **VEB**: Virus de Epstein-Barr

Las amplificaciones se efectuaron en un termociclador PTC 100TM, MJ Research (EU). Los ciclos de amplificación estuvieron constituidos por: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 94°C por 1 minuto, 52°C para la hibridación (primera reacción) o 47°C (segunda amplificación) por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto durante treinta ciclos de repeticiones.

Posteriormente, 10 µL de cada producto de PCR fue corrido mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta, utilizando un patrón de peso molecular preparado con una mezcla de casos positivos a todos estos herpesvirus, y que permite visualizar los diferentes tipos de herpesvirus según la talla de la banda de ADN observada. Se utilizaron controles en cada ensayo constituidos por: 1 muestra embebida en parafina de un caso que tenía diagnóstico previo de citomegalovirus generalizada, donde debía aparecer una banda a nivel del CMV y no del VHH8; ADNg extraído de la línea celular BCP-1; y como control negativo de cada ensayo se empleó agua bidestilada estéril.

Para la realización de este ensayo, se tuvieron en cuenta todas las medidas necesarias para evitar las contaminaciones del PCR, como son: la utilización de puntas con barreras, guantes, así como de materiales nuevos y estériles. El empleo de distintos locales (laboratorios) para hacer los pasos de extracción de ADN, la primera y la

segunda reacción de amplificación, y la corrida electroforética; el empleo de pipetas diferentes para cada paso, entre otras.

III.2.3 Caracterización de los pacientes cubanos con SK

Se recogieron todos los datos clínicos, epidemiológicos y anatomopatológicos de la población de pacientes cubanos con SK estudiada; para ello obtuvimos los datos a partir del Registro Nacional de VIH del MINSAP, de las Historias clínicas de los pacientes, del informe anatomopatológico así como de la encuesta personal en el caso de los pacientes vivos al momento del estudio. Se anexa la encuesta con los datos que se recogieron (Ver Anexo III). Se emplearon los métodos de estadística descriptiva para analizar y presentar los resultados obtenidos.

III.3- Caracterización molecular del VHH8 en muestras clínicas de pacientes cubanos y alemanes.

III.3.1 Muestras

Las muestras empleadas para la caracterización molecular incluyen 40 muestras de biopsias de piel o autopsias de 39 pacientes cubanos con SK epidémico (un paciente tenía dos muestras), diagnosticados clínicamente entre los años 1991 y 2004 en el IPK y confirmados por análisis histopatológico y/o por detección de VHH8 mediante PCR del gen de la ADN polimerasa (acápite III.2.1).

Se, emplearon además 19 biopsias de lesiones de piel de 18 pacientes alemanes con SK (un paciente tenía dos muestras) diagnosticados clínica e histológicamente durante los años 1990 al 2002 por el Departamento de Anatomía Patológica de las Universidades de Essen y Dusseldorf en Alemania, con el objetivo de compararlas con las muestras cubanas. Seis de dichas muestras correspondían a 5 pacientes clasificados clínica y epidemiológicamente como SK clásico, y las 13 restantes como SK epidémico.

Finalmente, también se utilizaron 22 muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de contactos sexuales asintomáticos de pacientes cubanos con SK epidémico (se explica con detalle en el acápite III.4.1 inciso a).

III.3.2 Extracción de ADN y PCR

La extracción de ADN para las muestras cubanas fue la misma que se describió en el acápite III.2.2 para la amplificación del gen de la ADN polimerasa viral.

Las muestras alemanas embebidas en parafina fueron tratadas con Xilol, rehidratadas en alcohol y secadas de la misma forma que se explicó en el acápite III.2.2. Después de este proceder, las muestras embebidas en parafinas así como las congeladas, fueron procesadas para extracción de ADN usando el estuche comercial QIAmp DNA Minikit (QIAGEN, EU). El mismo proceder se usó para la extracción de ADN de CMSP (se describe en detalles en los acápites III.4.1 y III.4.2); el ADNg fue eluído en 100 µL de H₂O bidestilada.

El gen ORFK1 fue amplificado empleando la técnica de PCR. Cinco microlitros del ADNg y 2 µL del producto de PCR fueron usados para la primera y la segunda reacción, respectivamente. Para la primera reacción de amplificación se utilizó un juego de cebadores que amplifican 1027 pares de bases: los 870 pb que componen el gen ORFK1, así como los extremos de las secuencias anteriores y posteriores (nt 65 al 1092):

- K1S 5'-CCTGTCTTTCAGACCTTGTTGGAC-3'
- K1AS 5'-TGCTTTTAATAAGTATCCGACCTC-3'

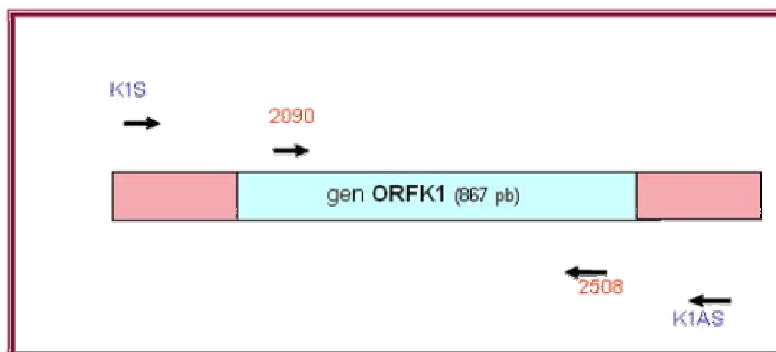


Figura 13. Diagrama del diseño de los cebadores que se emplearon para amplificar el gen ORFK1. Primera reacción: **K1S/K1AS** (1027pb). Segunda reacción (anidada): **2090/2508** (621pb)

Para la segunda reacción anidada, usamos un juego interno de cebadores descrito previamente por Zong y colaboradores en 1999 denominados 2090 (positivo) y 2508 (negativo), cuyas secuencias son:

2090: 5'-GAGTGATTTCAACGCCTTAC-3' y 2508: 5'-AGATACCACACATGGTT-3', los cuales amplifican un fragmento de 621 pb (nt 117 al 738), cubriendo así las dos regiones variables de este gen (Zong y cols., 1999) (Figura 13).

Las muestras fueron colocadas en 50 µL de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 2 mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleótido y 2.5 U de enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (Roche, EU). Las amplificaciones se efectuaron en un termociclador PTC-200 y el programa de ciclaje que se siguió fue de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 52°C para la hibridación (primera reacción) ó 47°C (segunda amplificación) por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto.

Posteriormente, 10 µL de cada producto de amplificación fue corrida por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, teñida con bromuro de etidio y visualizada en un transiluminador de luz ultravioleta. En cada ensayo se incluyeron controles negativos (agua y ADN celular no infectado) y positivos (ADNg de las células BC-3 o BCBL, que son líneas celulares de LEP infectadas con HASK).

III.3.3 Secuenciación de ácidos nucleicos

Los productos de PCR fueron corridos electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% y las bandas de amplificación obtenidas de cada caso fueron cortadas del gel y purificadas usando el estuche comercial QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN, EU), según el protocolo que provee el estuche. Los fragmentos de PCR purificados fueron secuenciados directamente usando un secuenciador automático Beckman Coulter (CEQ TM 8000 Genetic Analysis – System Beckman Coulter, EU) de acuerdo al protocolo del productor. Todas las secuencias para cada muestra fueron realizadas en ambos sentidos.

En la secuenciación se emplearon los mismos juegos de oligos que se usaron en el PCR, y en el caso de las muestras donde se obtuvieron amplificaciones desde la primera reacción, se emplearon los cebadores de la primera y de la segunda reacción con el fin de secuenciar completamente el gen. Las secuencias resultantes fueron editadas usando el programa Sequencher version 4.1 (EU).

III.3.4 Análisis filogenético

Se empleó el programa Clustal X version 1.81 para el alineamiento de las secuencias nucleotídicas y de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de las primeras, se realizó alineamiento múltiple con una penalidad abierta de interrupciones de 10, y una penalidad extendida de 5. Los árboles filogenéticos fueron construidos con el método Neighbor Joining (NJ) (distancia Tamura-Nei) del Programa MEGA 2.1 y los sitios con interrupciones ("gaps") se excluyeron del análisis filogenético. El patrón de ramas fue estimado mediante una matriz de distancia usando el método NJ, y los niveles de confianza para el patrón de las ramas de los árboles filogenéticos fueron estimados mediante análisis de remuestreo utilizando 1000 réplicas de árboles obtenidos por NJ (reconocido internacionalmente con el término "bootstrap").

III.3.5 Procesamiento estadístico de los resultados

Se utilizaron los métodos de estadística descriptiva para analizar los resultados. Se correlacionaron los datos demográficos, epidemiológicos y clínicos de los pacientes estudiados (incluyendo años de evolución del SK, tipo histológico y localización del SK; ver Anexos III y IV), con los resultados del estudio filogenético.

III.4 Determinación de la carga viral del VHH8 en pacientes con SK y en contactos sexuales asintomáticos

III.4.1 Poblaciones estudiadas y muestreo

a) Contactos sexuales de pacientes con SK:

Para el estudio de cuantificación del VHH8 se incluyeron 22 individuos cubanos, seropositivos al VIH-1 que eran contactos sexuales de pacientes con SK, los que se encontraban libres de síntomas y signos clínicos de SK. Algunos pacientes fueron seleccionados a partir del Registro Nacional de VIH del MINSAP por personal autorizado, otros individuos asistieron a la consulta médica traídos por su pareja sexual con SK.

Los pacientes fueron citados a la consulta de Dermatología del IPK, donde se les brindó información sobre el SK así como se les explicó las características del estudio. Todos llenaron y firmaron el modelo de consentimiento informado y un cuestionario confeccionado al efecto (Anexos IV y V). Además, se les hizo un examen físico

exhaustivo. Los datos clínicos y epidemiológicos, el conteo de Linfocitos T CD4+ (CD4) y carga viral de VIH se obtuvo de las historias clínicas de cada paciente y del Registro Nacional de VIH del MINSAP. Las muestras fueron colectadas durante el mes de Abril del 2004.

Para la toma y procesamiento de las muestras de estos individuos se siguieron los pasos que se detallan a continuación. Se extrajeron 20 mL de sangre a cada uno de los 22 pacientes (3 mujeres y 19 hombres) que se colocaron en tubos con citrato de sodio al 2%. La sangre fue diluida al doble con PBS estéril y goteada lentamente en tubos de centrífuga de 50 mL que contenían Ficoll-hypaque (SIGMA, EU) para ser sometida a aislamiento de CMSP mediante centrifugación a 2000xg por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de extraer el anillo de células mononucleares, se le hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno mediante centrifugación a 4500xg con solución de Hank (SIGMA), el precipitado celular obtenido de cada muestra se resuspendió en 200 µL de PBS estéril para ser sometido a extracción de ADN.

Por otro lado, parte del plasma de cada paciente obtenido durante el aislamiento de células mononucleares, se empleó para la detección de Acs anti-LANA (ver acápite III.1.1).

b) Pacientes con SK:

Se emplearon 17 muestras de tejidos (piel) embebidos en parafina o congelados de pacientes alemanes con SK. Todos estos pacientes habían sido diagnosticados durante los años 1990 al 2002 (ver acápite III.3.1).

c) Controles negativos:

Se incluyeron 5 trabajadores de laboratorio seronegativos al VIH-1 y con bajo riesgo de infección para el VHH8 (3 mujeres y 2 hombres), con rango de edades de 27 a 42 años. De las muestras de sangre de estos individuos se aislaron las CMSP, usando el mismo proceder descrito anteriormente para los contactos sexuales (III.4.1.a). Además, se incluyó H₂O como control negativo en cada ensayo.

d) Control positivo:

Se utilizó ADNg (4µg/mL) de la línea celular BC-3, donado por la Universidad de Essen en Alemania.

III.4.2 Extracción de ADN

El ADNg fue extraído de todas las CMSP, usando el estuche comercial de QUIAGEN (QIAmp DNA Minikit, EU), siguiendo el protocolo recomendado por los productores, y el producto final fue eluído en 100 µL de agua bidestilada estéril.

El ADNg de las muestras de tejidos se extrajo según el método descrito en el acápite anterior (III.3.2) para las muestras alemanas.

Las concentraciones del ADNg de las CMSP, de los tejidos, y de la línea celular BC-3 fueron medidas en un espectrofotómetro y 50 nanogramos (ng) de ADNg se emplearon para el PCR en Tiempo Real.

III.4.3 PCR en Tiempo Real (Taq Man)

Debido a la novedad de este ensayo, describiremos brevemente el fundamento del mismo. Durante cada ciclo de PCR se monitorea la cantidad de fluorescencia que se produce cuando un oligonucleótido fluorogénico es activado por la actividad exonucleasa 5'a 3'de la Taq polimerasa después de la unión a los productos específicos de PCR. Se determinará el número de ciclos de PCR requeridos para alcanzar un umbral de fluorescencia (*CT*) para cada muestra y el valor medido es comparado con los valores estándares de ADN moldes con concentraciones conocidas para determinar la concentración de comienzo de la amplificación en la muestra. Debido a que el *CT* es determinado durante la fase exponencial del PCR, el valor de *CT* tiene una relación lineal con el logaritmo de las concentraciones de ADN molde.

La cantidad de ADN del VHH8 presente en las preparaciones de CMSP y en tejidos fue determinada mediante amplificación por PCR en Tiempo Real (Applied Biosystem 7300 Real Time PCR system, Reino Unido) usando un juego de oligonucleótidos y sonda diseñados con el programa Primer Express Software (Applied Biosystem), que amplifica y detectan un amplicón de 100 pb en la región del gen ORFK1 del HASK desde el nucleótido 386 al 486. Esta región es altamente conservada entre los 5 genotipos del VHH8 (Zong y cols., 1999 y 2002); las secuencias se citan a continuación:

- oligonucleótido positivo: 5'-ACCAAACGGACGAAATGATCTAA-3'
- oligonucleótido negativo: 5'-CAGTTTGGTTCATCAGCGTAAAATT-3'

- sonda fluorogénica Taqman: 5'CGTGTCACAACTAAA3'.

A cada pozo de la placa de 96 pocillos se le añadió 2 μL (50 ng , determinados por espectrofotométricamente) de muestra (ADNg extraído de cada caso) y 23 μL de mezcla consistente en: 13 μL de mezcla Universal de PCR (Applied Biosystem) y 5 μL , 200nM y 300nM de oligonucleótidos y sonda, respectivamente. Los parámetros de los ciclos fueron: 50°C 2 min, 95°C 10 min y 50 ciclos de 95°C 15 seg y 60°C 1 min. Cada muestra fue analizada por triplicado, y al final se calculó el promedio entre los tres valores.

La detección del ADN del gen de la β globina humana en cada muestra (empleando un juego de oligonucleótidos y sonda suministrados por Applied Biosystem) fue usada como control interno para comprobar que la cantidad ADNg empleado en cada muestra era la misma (50 ng).

La línea celular BC-3 se usó para la estandarización del sistema y para construir la curva estándar; la misma tiene una cantidad conocida de ADN del VHH8 en el rango de 40 a 80 copias por células (Renne y cols., 1996; Curreli y cols., 2003). El ADNg fue extraído a partir de 5×10^6 células, y disuelto en 200 μL de tampón Tris-EDTA (TE) con una concentración total de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De ello se calcula que en 1 μL existen 25×10^3 células (aproximadamente entre 1 y 2×10^6 copias de HASK). Se hicieron diluciones seriadas en base 10 (desde puro hasta 10^{-5}) comenzando por $1-2 \times 10^6$ hasta 10 copias de ADN de VHH8. Los resultados de la amplificación fueron ubicados en una gráfica para construir la curva estándar mediante análisis de regresión lineal de los *CT* frente a los logaritmos de las concentraciones de ADN del VHH8 empleados.

Posteriormente, los valores obtenidos en las muestras clínicas fueron ubicados en la curva estándar que se construyó con el ADN del VHH8 amplificado de la línea celular BC-3, calculándose así el número de genomas del virus por μg de ADN en cada muestra.

III.4.4 Análisis estadístico

Se determinó la sensibilidad (S), especificidad (E), Valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del PCR en Tiempo Real y del PCR anidado para ORFK1 frente a la prueba estándar (IFI), teniendo en cuenta los siguientes conceptos.

Sensibilidad: Es la proporción de personas verdaderamente enfermas que han sido catalogadas como tales por la prueba.

Especificidad: Es la proporción de personas verdaderamente no enfermas que hayan sido catalogadas como tales por la prueba.

VPP: Es la probabilidad de que haya enfermedad si la prueba fue positiva. Su complemento es la tasa de falsos positivos (% de personas con resultado positivo que en realidad tienen la enfermedad de interés).

VPN: Es la probabilidad de que no haya enfermedad si la prueba fue negativa. Su complemento es la tasa de falsos negativos (% de personas con resultado negativo que en realidad no tienen la enfermedad de interés).

Para ello se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$E = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

Para conocer si existía asociación significativa entre la carga viral de VHH8 con la carga viral de VIH y con el conteo de CD4 en los pacientes cubanos asintomáticos, se empleó el análisis de correlación no paramétrica por rangos de Spearman, para determinar el coeficiente de correlación.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Seroprevalencia de anticuerpos al VHH8 en diferentes grupos de población cubana sexualmente activa

IV.1.1 Datos demográficos y epidemiológicos de los 5 grupos de individuos estudiados serológicamente

En la tabla 4 se muestran los datos demográficos de los 5 grupos de individuos empleados en el estudio serológico. Los 45 pacientes con SK asociado a SIDA se encontraban en las edades entre 17 y 58 años (media 33.4 años). Según el color de la piel, 32 eran blancos (71.1%), 7 eran negros (15.6%) y 6 eran mestizos (13.3%) (datos no mostrados en la tabla). El factor de riesgo de homosexualidad/bisexualidad se encontró en 32 de los 36 hombres estudiados (88.9%). Las 9 mujeres comprenden un quinto del total de pacientes con SK incluidos en el estudio (20%). Tres de los 4 hombres heterosexuales con SK adquirieron el VIH en África, mientras que las mujeres con SK asociado a SIDA refirieron haber tenido múltiples contactos con hombres bisexuales.

Tabla 4. Características demográficas de los 5 grupos de individuos que se emplearon para la determinación de anticuerpos al Herpesvirus Asociado al Sarcoma de Kaposi, 1991-2004.

Características Demográficas	Pacientes con SIDA y SK (n = 45)		Pacientes VIH/SIDA sin SK (n = 154)		Donantes de sangre (n = 171)		Receptores trasplante renal (n = 27)		Contactos de pacientes con SK (n = 36)	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Edad (años)										
15-24	8	17.7	71	46.1	9	5.3	21	77.8	2	5.5
25-30	12	26.7	41	26.6	33	19.3	4	14.8	11	30.6
>30	25	55.6	42	27.3	129	75.4	2	7.4	23	63.9
Sexo										
F	9	20.0	34	22.1	35	20.5	8	29.6	10	27.8
M	36	80.0	120	77.9	136	79.5	19	70.4	26	72.2
Orientación sexual										
HSH	32	71.1	104	67.5	ND	ND	ND	ND	26	72.2
HTM	4	8.9	16	10.4	ND	ND	ND	ND	0	0.0
HTF	9	20	34	22.1	ND	ND	ND	ND	10	27.8

Abreviaturas: F: Femenino; M: Masculino; HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HTM: Heterosexuales Masculinos; HTF: Heterosexuales Femeninos; ND: datos no disponibles.

Fuente: Registro Nacional de VIH del MINSAP. Historias clínicas, IPK

En el grupo de individuos seropositivos al VIH sin SK el rango de edad estuvo entre 16 y 70 años (edad promedio 38.3); 119 de los 154 (77.3%) eran blancos, 14 (9.1%), eran negros y 21 (13.7%) eran mestizos (datos no mostrados en la tabla). El comportamiento sexual de este grupo fue similar al reportado para los pacientes con SK asociado a SIDA.

El grupo constituido por los contactos de pacientes con SK estuvo integrado por 26 HSH, que eran parejas sexuales de pacientes con SK, y 10 mujeres, 8 de ellas eran parejas sexuales y 2 eran madres de pacientes con SK. Todas las parejas sexuales eran personas seropositivas al VIH, de ellas solo dos se encontraban en estadio SIDA.

En las personas seropositivas al VIH estudiadas, con y sin SK, se observó un predominio de la piel blanca, lo cual es coincidente con los reportes hechos previamente por Pérez y colaboradores en 1993, al caracterizar la epidemia cubana de VIH (Pérez y cols., 1993).

IV.1.2 Determinación de anticuerpos frente al VHH8 en los 5 grupos estudiados

Como se observa en la Tabla 5, de los 45 pacientes con SK asociado a SIDA, 37 (82.2%) resultaron positivos de Acs al VHH8 empleando la técnica de IFI anti-LANA, detectándose el patrón nuclear de fluorescencia característico de infección con el VHH8 (Figura 14).

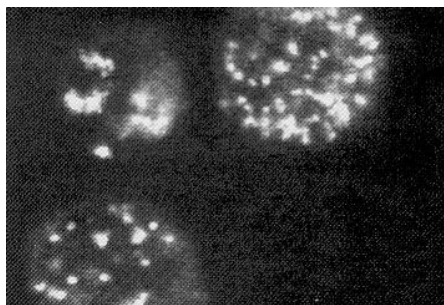


Figura 14. Inmunofluorescencia positiva de Acs anti-LANA en un paciente con SK, utilizando la línea celular BCP-1. Magnificado 40x.

Por otra parte, 32 (20.8%) de los 154 individuos seropositivos al VIH sin SK resultaron tener Acs frente al VHH8. De los 171 donantes de sangre (todos seronegativos al VIH), sólo 2 (1.2%) presentaron Acs al virus, mientras que ninguno de los 27 pacientes receptores de trasplante los tenían. En el grupo de contactos, se detectó la presencia de Acs frente al HASK en 24 de las 36 personas (66.6%). (Tabla 5). Las dos madres de los pacientes con SK resultaron negativas de Acs al VHH8.

Tabla 5. Resultados de la determinación a ciegas de la reactividad de Acs frente al Antígeno nuclear asociado a la latencia (LANA) del Virus del Herpes Humano 8 (VHH8) en las 433 muestras de suero analizadas de los 5 grupos de individuos estudiados, 1991-2004.

Cohorte de estudio	Número de sujetos testados	IFI anti-LANA Positiva	
		No.	%
Pacientes con SIDA y SK	45	37	82.2 ^a
Pacientes VIH/SIDA sin SK	154	32	20.8 ^a
Donantes de sangre	171	2	1.2
Receptores de transplante renal	27	0	0.0
Contactos de pacientes con SK	36	24	66.6 ^a

^a $P < 0.0001$, con la prueba de Fisher después de la comparación del grupo indicado con el grupo de donantes de sangre. Abreviaturas: IFI: Inmunofluorescencia Indirecta; LANA: Antígeno latente nuclear; SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana; SK: Sarcoma de Kaposi.

Fuente: Laboratorio de ETS. Departamento de Virología, IPK.

El 82.2% de positividad de Acs al VHH8 encontrado mediante la IFI en el grupo de pacientes con SIDA y SK, concuerda con reportes previos relacionados con el empleo de la IFI anti-LANA para realizar estudios de seroreactividad en este grupo de pacientes (Gao y cols., 1996a; Kedes y cols., 1996; Martin y cols., 1998). Los casos negativos dentro del grupo de pacientes con SK podrían deberse a diversas causas como son: la sensibilidad de la IFI que ha probado ser de alrededor de un 80% en el SK asociado a SIDA, las posibles congelaciones y descongelaciones que pueden haber sufrido algunos de los sueros más antiguos, y finalmente, algunos de estos pacientes pueden haberse encontrado en los estadios finales de la enfermedad resultando en una afectación severa de la inmunidad humoral y celular, que sería la responsable de la respuesta falso-negativo al VHH8, de la misma manera que se ha descrito previamente para el VIH (Moore y Chang, 2001).

Los porcentos de prevalencia al VHH8 que encontramos en los diferentes grupos de individuos analizados en nuestro estudio, sugieren un patrón de infección similar al encontrado en EU, Norte de Europa y Japón, donde se reportan valores de seroprevalencia en la población general seronegativa al VIH entre un 0 y un 10%, mientras que en pacientes con SK se encuentra entre un 70 y un 90%; por otra parte, en individuos seropositivos al VIH sin SK, los valores oscilan alrededor de un 30% (Smith y cols., 1999; Whitby y cols., 1999; Katano y cols., 2000).

Sin embargo, nuestros resultados se comportaron de manera diferente de aquellos reportados en poblaciones como Italia y Uganda, dos países donde el virus se encuentra diseminado en la población, reportándose niveles de seroprevalencia que pueden alcanzar hasta el 50% (Whitby y cols., 1998; Perna y cols., 2000; Ziegler y cols., 2003; Stein y cols., 2004).

Nuestros resultados fueron también similares a los reportados por Keller y colaboradores en Brasil (Keller y cols., 2001). Ellos reportaron una prevalencia de Acs al VHH8 de un 79.5% entre la población seropositiva al VIH con SK, y un 18.5% en aquellos sin SK. Debemos destacar que existe otro reporte de seroprevalencia de Acs al VHH8 en Cuba, para el cual se emplearon muestras residuales de un estudio de caso-control del Instituto de Oncología y Radiobiología en individuos seronegativos al VIH (Fernández y cols., 2002). En este estudio, contrario a nuestros resultados, se detecta un 16.9% de positividad de Acs frente al VHH8, pero en este caso se realizó la detección de Acs frente a Acs líticos del virus, y como se ha reportado anteriormente (Lennette y cols., 1996; Moore y Chang, 2001), las pruebas empleando Acs líticos tienen un porcentaje de sensibilidad más elevado (más de un 95% de positividad en individuos con SK), pero también tienen el riesgo de reactividad cruzada, especialmente a diluciones bajas del suero. Existen una serie de estudios de seroprevalencia en diferentes poblaciones empleando antígenos líticos, y en todos ellos se detectan niveles de seroprevalencia mucho más elevados al compararlos con aquellos estudios donde se emplean Acs latentes (Lennette y cols., 1996; Rezza y cols., 1998; Schulz y cols., 2002). La reactividad cruzada es la explicación para los elevados porcentajes de infección reportados en los estudios serológicos que emplean Acs líticos comparados con los que utilizan Acs latentes (Lennette y cols., 1996; Schulz, 2000; Moore y Chang, 2001; Schulz y cols., 2002).

IV.1.3 Análisis por subgrupos de la seropositividad a HASK entre sujetos positivos al VIH con y sin SK

Como se muestra en la Tabla 6 ambos sexos, tuvieron un porcentaje de infección al VHH8 relativamente alto. De los 182 hombres seropositivos al VIH, 76 (41.7%) se encontraron infectados con el HASK, mientras que de las 51 mujeres seropositivas al VIH, 17 (33.3%) también estaban infectadas con este herpesvirus.

La mayoría de las personas seropositivas al VIH estudiadas fueron HSH (162 individuos), por lo que la homosexualidad/bisexualidad no estuvo asociada significativamente a la presencia de Acs al VHH8 en las personas con SK o en las asintomáticas.

Al realizar el análisis por subgrupos encontramos que en el grupo de pacientes afectados con el SK, la proporción de HSH que fueron positivos al VHH8 fue un 81.2% (26 de 32), comparado con un 75% (3 de 4) para los hombres heterosexuales y de un 88.9% (8 de 9) para las mujeres (P=0.99). De igual manera se comportó el grupo de individuos seropositivos al VIH sin SK, donde la proporción de HSH que fueron seropositivos al HASK fue de un 21.1% (22 de 104), comparado con un 31.2% (5 de 16) para los hombres heterosexuales (P=0.36). En el grupo de los contactos sexuales, la proporción de HSH infectados con el VHH8 fue del 76.9% (20 de 26) ya que en este grupo no hubo ningún paciente masculino heterosexual. En previos estudios realizados por Whitby y colaboradores (Whitby y cols., 1999) y por Smith y colaboradores (Smith y cols., 1999) encontraron que la homosexualidad constituía un factor fuertemente asociado al SK Epidémico.

Tabla 6. Análisis de la seroreactividad al HASK en los diferentes subgrupos dentro de los pacientes seropositivos al VIH con y sin SK 1991-2004.

Características	Pacientes con SIDA y SK (n = 45)				Pacientes VIH/SIDA sin SK (n = 154)				Contactos sexuales de pacientes con SK, seropositivos al VIH (n = 34)				Total
	HASK+		HASK-		HASK+		HASK-		HASK+		HASK-		
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Edad													
15-24	5	55.5	4	44.6	4	5.6	68	94.4	0	0	2	100	83
25-30	7	70.0	3	30.0	10	23.3	33	76.7	6	54.5	5	45.5	64
> 30	25	96.2	1	3.8	18	46.2	21	53.8	18	85.7	3	14.3	86
Sexo													
Masculino	29	80.5	7	19.4	27	22.5	93	77.5	20	76.9	6	23.1	182
Femenino	8	88.9	1	11.1	5	14.7	29	85.3	4	50.0	4	50.0	51
Orientación sexual													
HSH	26	81.2	6	18.8	22	21.1	82	78.9	20	76.9	6	23.1	162
HTM	3	75.0	1	25.0	5	31.2	11	68.8	0	0	0	0	20
HTF	8	88.9	1	11.1	5	14.7	29	85.3	4	50.0	4	50.0	51

Abreviaturas: HSH: hombres que tienen sexo con hombres; HTM: Heterosexuales Masculinos; HTF: Heterosexuales Femeninos.

Fuente: Registro Nacional de VIH del MINSAP. Historias clínicas, IPK.

En contraste, en los grupos estudiados en esta investigación, observamos que los hombres heterosexuales y las mujeres constituyen un número importante de los casos con SK asociado a SIDA. (8.9 y 20% respectivamente, Tabla 4). Existen varios factores

que pueden haber influido en la presencia de estos diferentes hallazgos en Cuba, incluyendo el alto número de parejas sexuales y el tipo de prácticas sexuales en estos hombres heterosexuales y en las mujeres. Tres de los hombres en nuestro estudio adquirieron el VIH en África a través de contacto heterosexual, y pudieran haberse infectado al mismo tiempo con el VHH8. Las 9 mujeres con SK asociado a SIDA referían haber tenido múltiples contactos con hombres bisexuales.

No obstante, estos datos deben manejarse con mucha cautela ya que como sabemos, la mayoría de los individuos cubanos que viven con VIH (incluyendo los que se analizaron en nuestro estudio), son en su mayoría HSH (Pérez y cols., 1993). Este hecho pudiera ser otro factor que no nos permitió encontrar relación entre homo/bisexualidad e infección con el VHH8; por otro lado, el número de hombres heterosexuales incluidos en el estudio fue bajo.

En Cuba, los hombres y mujeres seropositivos al VIH (incluyendo aquellos con y sin SK) así como los contactos sexuales de pacientes con SK, tuvieron niveles de seroprevalencia al VHH8 relativamente altos. Este hallazgo coincide con lo reportado en diferentes estudios que se han realizado en poblaciones de individuos seropositivos al VIH sexualmente activos en Europa (Smith y cols., 1999).

Sin embargo, no existen estudios previos de contactos sexuales asintomáticos, por lo que este sería el primer reporte donde se pudo detectar un alto porcentaje de prevalencia de infección al VHH8 (66.6%). La mayoría de los investigadores consideran la homosexualidad como un factor de riesgo para la infección con el HASK, principalmente relacionado a la práctica de sexo anal no protegido en este grupo de individuos (Melbye y cols., 1998). Nuestros hallazgos permiten confirmar la vía de transmisión sexual como la más probable para el VHH8. Esto, obviamente no representa la ruta habitual de transmisión del VHH8 en los países endémicos, donde la mayoría de las transmisiones parecen ocurrir durante la niñez (Goudsmit y cols., 2000).

Consideramos que deben hacerse estudios más profundos de transmisión del virus en nuestro país con el objetivo de aclarar los hallazgos antes expuestos. Nuestros análisis son consistentes con observaciones previas que sugieren una fuerte asociación entre la seropositividad al VHH8 y el SK, así como de la vía de transmisión sexual como una de

las vías más efectivas de transmisión de este virus en individuos infectados con el VIH. Nuestros análisis también sugieren que el patrón de transmisión del VHH8 en Cuba se asemeja al descrito en EU y Europa del Norte (Whitby y cols., 1995; Gao y cols., 1996a). No obstante, no hicimos una selección al azar en la población cubana, sino que estudiamos donantes de un banco de sangre, que además eran negativos al Ag de superficie del VHB, VHC y VDRL. Por esta razón no podemos llegar a conclusiones definitivas sobre la circulación del VHH8 en la población seronegativa al VIH.

A pesar de ello podemos sugerir que la infección con el VHH8 no es frecuente en la población cubana seronegativa al VIH estudiada, y que se encuentra aparentemente limitada a individuos infectados con VIH, similar a lo reportado en países como Jamaica (Manns y cols., 1998), Brasil (Keller y cols., 2001), y EU (Gao y cols., 1996a).

Estos resultados son importantes ya que nos alertan sobre la circulación y el incremento de un nuevo virus entre la población cubana de individuos seropositivos al VIH. Ello debe servir de aviso para que se tomen medidas encaminadas a disminuir la transmisión del mismo, teniendo en cuenta que, de acuerdo a nuestros resultados al estudiar los contactos, una de las vías probables de transmisión es la sexual. Por otro lado el virus pudiera diseminarse a personas no seropositivas al VIH, representando una amenaza a la salud de nuestra población.

IV.2 Detección de ADN del VHH8 en tejido y saliva de pacientes con SK

IV.2.1 Características demográficas, clínicas y anatomopatológicas de los 72 pacientes cubanos con SK estudiados

Se estudiaron un total de 72 muestras de tejido de lesiones de piel (biopsia) o de autopsia de pacientes cubanos con SK asociado a SIDA diagnosticados durante los años 1991 hasta el 2004, así como 10 muestras de otras lesiones de piel también embebidas en parafina de pacientes seronegativos al VIH (Tabla 2, acápite III.2.1). Por otro lado, se estudiaron 22 muestras de salivas de pacientes con SK.

Al hacer la caracterización de los 72 pacientes cubanos con SK, se observó un predominio de HSH (56, 77.8%), sin embargo como ya se discutió previamente en el acápite IV.1, una característica de la población cubana con SK estudiada es la presencia relativamente alta de mujeres (11, 15.3%).

Se encontró con mayor frecuencia la forma cutánea de SK, descrito en 45 pacientes (62.5%) (Figura 15), y en menor frecuencia se presentaron las formas sistémica y mucocutánea de la enfermedad (15 y 12 casos, respectivamente).

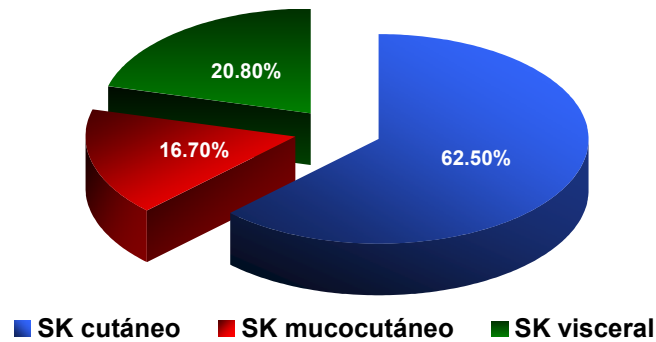


Figura 15. Tipo de Sarcoma de Kaposi Epidémico. 1991-2004.

Fuente: Informe Anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica. IPK.

Se observó un franco predominio de las lesiones múltiples en la piel (52 pacientes, 72.2%) y la lesión elemental más frecuente fue la mácula, describiéndose en 47 pacientes (65.3%). Las localizaciones más frecuentes de las lesiones en la forma cutánea de la enfermedad fueron las extremidades inferiores en 38 pacientes, seguidas por el tronco y los miembros superiores en 26 y 20 pacientes, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Localizaciones más frecuentes de las lesiones en el SK cutáneo. 1991-2004.

Localización	No. de Pacientes	Porcentaje
Extremidades superiores	20	27.7 %
Extremidades inferiores	38	52.7%
Tronco	26	36.1%
Cara	6	8.3%
Cuello	4	5.6%

Fuente: Informe Anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica. IPK.

De los 15 pacientes afectados con el SK sistémico o visceral, realizamos un análisis de los sistemas de órganos más afectados, los cuales se relacionan en la Tabla 8. Se

observó la afectación de más de un órgano en un mismo paciente. Se puede apreciar que el sistema digestivo fue el que mostró un mayor porcentaje de afectación (86.7%), y dentro de este, la mucosa oral y el intestino (5 casos, 38.5% cada uno) fueron los órganos más involucrados (Figura 16).

Tabla 8. Sistemas de órganos afectados en el Sarcoma de Kaposi epidémico sistémico. 1991-2004.

Sistemas de órganos	No. de Pacientes	Por ciento
Sistema Digestivo	13	86.7
Sistema Respiratorio	10	66.7
Sistema Hemolinfopoyético	10	66.7
Otros órganos	12	80.0

Fuente: Informe Anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica. IPK.

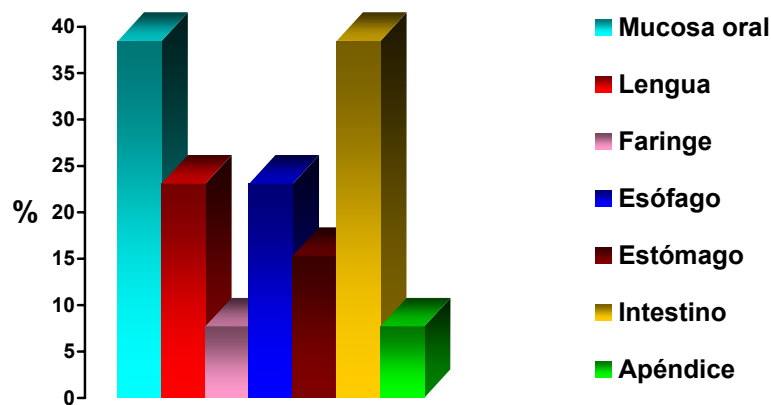


Figura 16. Localizaciones más frecuentes en el Sistema Digestivo. 1991-2004.

Fuente: Informe Anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica. IPK.

Como se observa en la Tabla 8, hubo 12 pacientes (80%) en los que el SK sistémico afectó además otros órganos: cuatro pacientes presentaron lesiones de SK en hígado (33.3%), en dos pacientes se reportó toma de pericardio y suprarrenales (16.7% cada

uno), mientras que la afección del páncreas, el riñón, la vejiga y el útero se reportaron en un paciente cada uno (8.3%).

Con respecto al tipo de SK reportado en el estudio histopatológico de los pacientes, como se observa en la Figura 17, la mayoría de los casos se diagnosticaron en estadios tempranos de la enfermedad, por lo que se observó un predominio de las formas histológicas inflamatoria (27 casos) y vascular o proliferativa (28 casos) que se corresponden clínicamente con los estadios de parches y placas, respectivamente. En menor frecuencia observamos la forma tumoral del SK, (17 pacientes) que se describe en los estadios más avanzados de la enfermedad (Lever y Schaumburg, 1983).

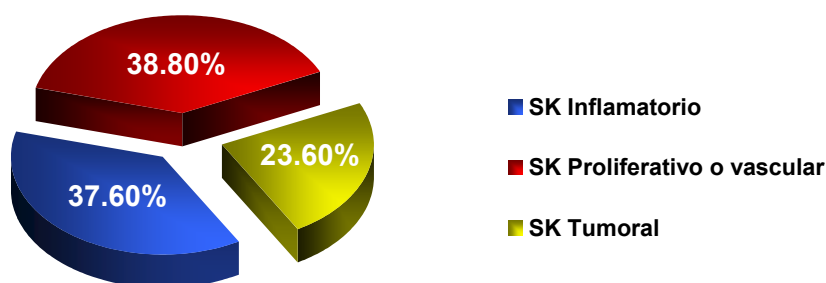


Figura 17. Tipos Histológicos de Sarcoma de Kaposi en los pacientes estudiados. 1991-2004.
Fuente: Informe Anatomopatológico. Departamento de Anatomía Patológica. IPK.

De manera general los datos encontrados en los pacientes cubanos con SK, son similares a los reportados en la literatura para el SK epidémico (Lever y Schaumburg, 1983; Hengge y cols., 2002 y 2004). Se plantea que, a diferencia de la forma clásica del SK, las lesiones en los pacientes con SIDA se localizan no solo en miembros inferiores, sino en el tronco, miembros superiores y cara (Moore y Chang, 2001; Hengge y cols., 2002 y 2004).

Se ha descrito que la forma más frecuente de aparición del SK cutáneo son las lesiones, solitarias o múltiples, que pueden presentarse desde máculas azul parduscas hasta tumores violáceos; son más variadas, de extensa distribución, menor tamaño y rápida progresión (Talbot y Whitby, 1999; Hengge y cols., 2002).

La afectación del tracto gastrointestinal parece ser la más frecuente dentro de la forma sistémica pudiendo causar hemorragias digestivas, enteropatías o cuadros obstructivos, aunque habitualmente, el paciente suele estar asintomático y la afectación visceral más

grave es la pulmonar, que frecuentemente ocasiona la muerte por hemorragia pulmonar masiva (Lever y Schaumburg, 1983).

IV.2.2 Detección de ADN del gen de la ADN polimerasa del VHH8 en muestras de tejido y saliva de pacientes con SK

Todas las muestras fueron sujetas a un PCR anidado múltiple que amplifica el gen de la ADN polimerasa viral y que permite detectar en una misma reacción la presencia del VHH8 y de otros herpesvirus linfotrópicos (VHH7, CMV, VHH6, VEB).

Se detectó la presencia de ADN del VHH8 en 70 (97.2%) de los 72 tejidos estudiados de pacientes con SK (Figura 18), reforzando la teoría de este agente como el causante de la enfermedad. Ninguna de las otras lesiones de piel de pacientes seronegativos al VIH fueron positivas al virus.

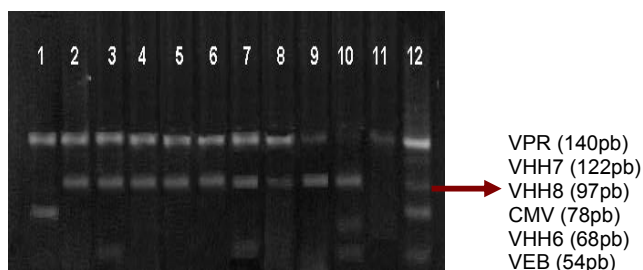


Figura 18. PCR Múltiple de Herpesvirus. Gel de Agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio donde se observa la amplificación de bandas de 97pb que corresponden con la talla esperada para el VHH8. El control interno (VPR) aparece como una banda de 140pb en todos los casos, indicando que la amplificación ocurrió eficientemente. En la **línea 1** aparece un caso positivo a CMV, empleado como control del ensayo, de la **línea 2 a la 10** aparecen casos positivos al VHH8. En la **línea 11** aparece el control negativo, y en la **línea 12** el patrón de peso molecular. Se observan además tres casos positivos al VEB (línea 3, 7 y 10) y uno al VHH6 (línea 10).

Existen actualmente una serie de estudios que han demostrado la presencia de ADN viral mediante PCR en al menos el 95% de los tumores de pacientes con SK, independientemente de la fuente (Cesarman y cols., 1995a; Schulz, 1998; Schulz y Moore, 1999; Moore y Chang, 2001). Pudiera ser posible que un pequeño porcentaje de lesiones de SK se encuentren libres de infección por el HASK, pero se asume que el virus deberá siempre ser detectado en muestras que sean adecuadamente procesadas.

Por otro lado, en nuestro estudio, se detectaron 14 muestras de saliva (63.6%) positivas al virus, lo que indica que el virus está también presente en este fluido y que esta pudiera constituir otras de las posibles vías de transmisión del VHH8. Se han realizado pocos estudios de detección del VHH8 en muestras de saliva, los cuales han arrojado

resultados controversiales. Algunos autores han encontrado viriones infecciosos y ADN del HASK en saliva de pacientes con SK-SIDA, demostrando la replicación del virus en la orofaringe (Koelle y cols., 1997; Pauk y cols., 2000; Taylor y cols., 2004). Sin embargo, no se ha encontrado la presencia del VHH8 en saliva de pacientes con SK clásico ni en aquellos infectados pero asintomáticos (Talbot y Whitby, 1999).

Se desconoce por qué si el HASK, puede ser transmitido a través de las secreciones orales, el virus mantiene un patrón de transmisión sexual más que por contacto oral (Pauk y cols., 2000). Las prácticas sexuales como son el contacto oroanal y orogenital pudieran ayudar a explicar esto. Estudios recientes de cohorte apuntan hacia el contacto orogenital como un factor de riesgo para la transmisión (Grulich y cols., 1999; Hengge y cols., 2004), sin embargo esto no explica por qué los hombres homosexuales tiene riesgos más elevados de transmisión.

El hecho de no haber encontrado el virus en las muestras de saliva de todos los pacientes con SK estudiados, nos puede hacer pensar que el VHH8, al ser un virus latente, se excreta de manera intermitente, durante los períodos de reactivación viral al igual que ocurre con los otros miembros de la familia *Herpesviridae* (Roizman y Pellet, 2001).

No se conoce con exactitud la epidemiología de la transmisión del HASK, por ello existe mucha especulación acerca de cómo ocurre la infección con el virus. Estudios seroepidemiológicos sugieren el VHH8 tiene al menos dos modos principales de transmisión. La transmisión sexual es la forma más común de transmisión en países desarrollados con bajos niveles de prevalencia, donde la infección es poco común. Sin embargo en las regiones de África donde la enfermedad es endémica y frecuente desde la niñez, predominan las rutas de transmisión no sexual (Schulz y cols., 2002).

Es de señalar que, debido a que se empleó un PCR múltiple que permite detectar además del VHH8 otros herpesvirus, se pudo demostrar coinfección en varios casos (algunos de ellos se observan en la Figura 17) del VHH8 con otros virus (CMV en 2 casos; 3 casos con VHH6 y VEB, respectivamente y también un caso con VHH7), tanto en tejido como en saliva. Al tratarse de individuos infectados con el VIH, que además se encontraban en estadio SIDA, no es extraño detectar la presencia de otros Herpesvirus

que se conoce son ubicuos en todas las poblaciones adultas y que en estados de inmunosupresión se reactivan frecuentemente (Roizman y Pellet, 2001). Estos hallazgos han sido reportados por otros autores al emplear este tipo de técnicas de alta sensibilidad (Weber y cols., 1996).

IV.3 Caracterización molecular del VHH8 en muestras clínicas de pacientes cubanos y alemanes.

IV.3.1 Resultados del PCR y la secuenciación de ácidos nucleicos

Al realizar la PCR anidada del gen ORFK1 descrita por Zong y colaboradores (Zong y cols., 1999) para las muestras referidas anteriormente, pudimos amplificar el ADN del VHH8 en el 100% de las muestras de tejidos utilizadas en el estudio, obteniendo en total: 40 productos de PCR de 39 pacientes cubanos con SK epidémico y 19 de 18 pacientes alemanes con SK (5 clásicos y 13 epidémicos); en el caso de los contactos sexuales de pacientes cubanos con SK, detectamos infección con el VHH8 en 11 de las 22 muestras de CMSP, es de señalar que estos pacientes también habían resultado positivos de Acs anti-LANA mediante IFI (acápite **IV.1.2**). En 15 de las 40 muestras de pacientes cubanos con SK se logró amplificar completamente el gen ORFK1 (primera reacción de amplificación), mientras que en las restantes se amplificó un fragmento de 621pb de los 867 nucleótidos que tiene el gen (reacción anidada). Este fragmento incluye desde el nucleótido 117 al 738 (aa 39 al 246) donde se encuentran las dos regiones variables (RV1 nt 162 a 279; aa 54 a 93 y RV2 nt 573 a 684; aa 191 a 228) y una región constante intermedia (RC), lo cual es suficiente para hacer el análisis molecular del VHH8 (Figura 19) (Zong y cols., 1999).

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y sometidos a secuenciación nucleotídica del gen ORFK1. En el caso de las 15 muestras que se lograron amplificar en el primer PCR, se usaron oligonucleótidos intermedios (los mismos usados para amplificar el fragmento de 621pb) para lograr secuenciar completamente el gen. En las muestras restantes se secuenció el fragmento de 621 pb empleando los mismos oligonucleótidos con que se realizó la reacción de amplificación anidada.



Figura 19. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se observa la amplificación de un fragmento de 621 pb correspondiente al gen ORFK1 del VHH8. **Carril 1.** Patrón de peso molecular (100pb ladder, Promega). **Carriles 2 al 6,** pacientes con SK. **Carriles 7 al 10** casos correspondientes a contactos sexuales de pacientes con SK.

Todos los productos de PCR purificados, con la excepción de uno (un contacto sexual débil positivo), tuvieron la calidad requerida para poder ser secuenciados, por lo que al final obtuvimos las secuencias del VHH8 esperadas: 50 de las muestras cubanas y 19 de las alemanas.

De las muestras cubanas de pacientes con SK, obtuvimos 15 secuencias completas, el resto fueron parciales.

IV.3.2 Datos demográficos y clínicos de los pacientes

En consistencia con otros estudios ([Goedert](#) y cols.,1997; [Kedes](#) y cols., 1997; Whitby y cols., 1999) se demostró nuevamente un predominio del sexo masculino en 10 de las 11 muestras de contactos sexuales asintomáticos que se detectaron infectados con el HASK (90.9%) mediante el PCR anidado del gen ORFK1, en 36 de los 39 pacientes cubanos con SK (92.3%) y en 17 de los 18 (94.4%) pacientes alemanes con SK. Con la excepción de dos pacientes que adquirieron el VIH en África (Cu44 y Cu49), el resto de los pacientes cubanos con SK incluidos en el estudio se infectaron con VIH en Cuba. La edad promedio no mostró diferencias significativas entre los pacientes cubanos con SK y los contactos sexuales asintomáticos (33.1, con un rango de 18 a 58 y 38.2, rango de 28 a 63, respectivamente). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en el promedio de edad entre los pacientes alemanes con SK clásico (edad promedio 72.2, rango de 65 a 84) y los que tenían SK asociado a SIDA (edad promedio 41.1, rango 28 a 57) $p < 0.01$.

Entre los pacientes cubanos infectados con el VHH8 (con SK y asintomáticos), 30 eran blancos, 5 y 14 eran negros y mulatos, respectivamente. Por el contrario, los pacientes alemanes eran pacientes blancos de origen caucásico exceptuando uno, originario del medio oriente.

Respecto al comportamiento sexual, la mayoría de los pacientes cubanos eran HSH 42 de 49 (85.7%), y los pacientes heterosexuales estaban constituidos por 4 mujeres y 3 hombres (8.2 y 6.1%, respectivamente). Entre los pacientes alemanes, todos los pacientes con SK-SIDA eran homosexuales (13, 72.2%).

IV.3.3 Análisis Filogenético

Una vez editadas todas las secuencias nucleotídicas de K1, las introdujimos en el GenBank con el propósito de buscar aquellas secuencias de referencias que se acercaban más a nuestras secuencias, con el fin de construir los árboles filogenéticos. Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal X versión 1.81 y posteriormente fueron analizadas con el programa Mega versión 2.1 usando el método de NJ con 1000 “bootstraps”. Para el análisis filogenético solo se empleó el fragmento de 621 pb, con el objetivo de que todas las secuencias tuvieran la misma longitud. En total se analizaron 96 secuencias de VHH8, las 69 secuenciadas en este estudio, más 27 obtenidas del GenBank y empleadas como referencias (ver **Anexo I**).

Como se muestran en las Figuras 20 (secuencias nt) y 21 (secuencias aa.), los tres principales genotipos reportados en la literatura; A, B y C, así como el genotipo E descrito recientemente fueron identificados claramente en las secuencias de las muestras analizadas, basados en asociaciones topológicas y altos valores de “bootstraps”.

La caracterización filogenética mostró que 13 de las 19 secuencias de las muestras alemanas fueron clasificadas dentro del genotipo C (68.4%), mientras que 6 se agruparon como A, (31.6%). Los genotipos A y C son considerados de origen Europeo, de acuerdo a la hipótesis de Zong y colaboradores, que evolucionaron de un ancestro común hace 35000 años (Zong y cols., 2002). Todos las secuencias de VHH8 de pacientes con SK clásico se incluyeron en el genotipo C, mientras que las secuencias virales de pacientes con SK asociados a SIDA fueron A ó C, en concordancia con reportes previos (Schulz y cols., 2002).

La posible asociación entre genotipos específicos de HASK y diferentes tipos de SK han sido sugeridas por algunos autores (Boralevi y cols., 1998; Shulz, 2000), desafortunadamente, estos datos se basaron en pequeños fragmentos del gen ORF26, los estudios más recientes del gen ORFK1 han mostrado que no existe asociación entre genotipos y enfermedad (Cook y cols., 1999; Meng y cols., 1999; Zong y cols., 1999). En este estudio, a pesar de que todas las secuencias del HASK de pacientes con SK clásico fueron clasificadas dentro del genotipo C, también encontramos este genotipo entre las secuencias de VHH8 de los pacientes alemanes y cubanos con SK asociado a SIDA, así como en los contactos sexuales asintomáticos.

Por otro lado, intentamos establecer correlación entre los datos clínicos de los pacientes cubanos con SK (evolución del SK desde su diagnóstico hasta el momento actual o hasta la fecha de fallecimiento, forma de presentación de SK, tipo histológico, localización de las lesiones y sobrevida del paciente) y los genotipos y subtipos detectados, no encontrándose relación alguna entre genotipo, subtipo y evolución de la enfermedad.

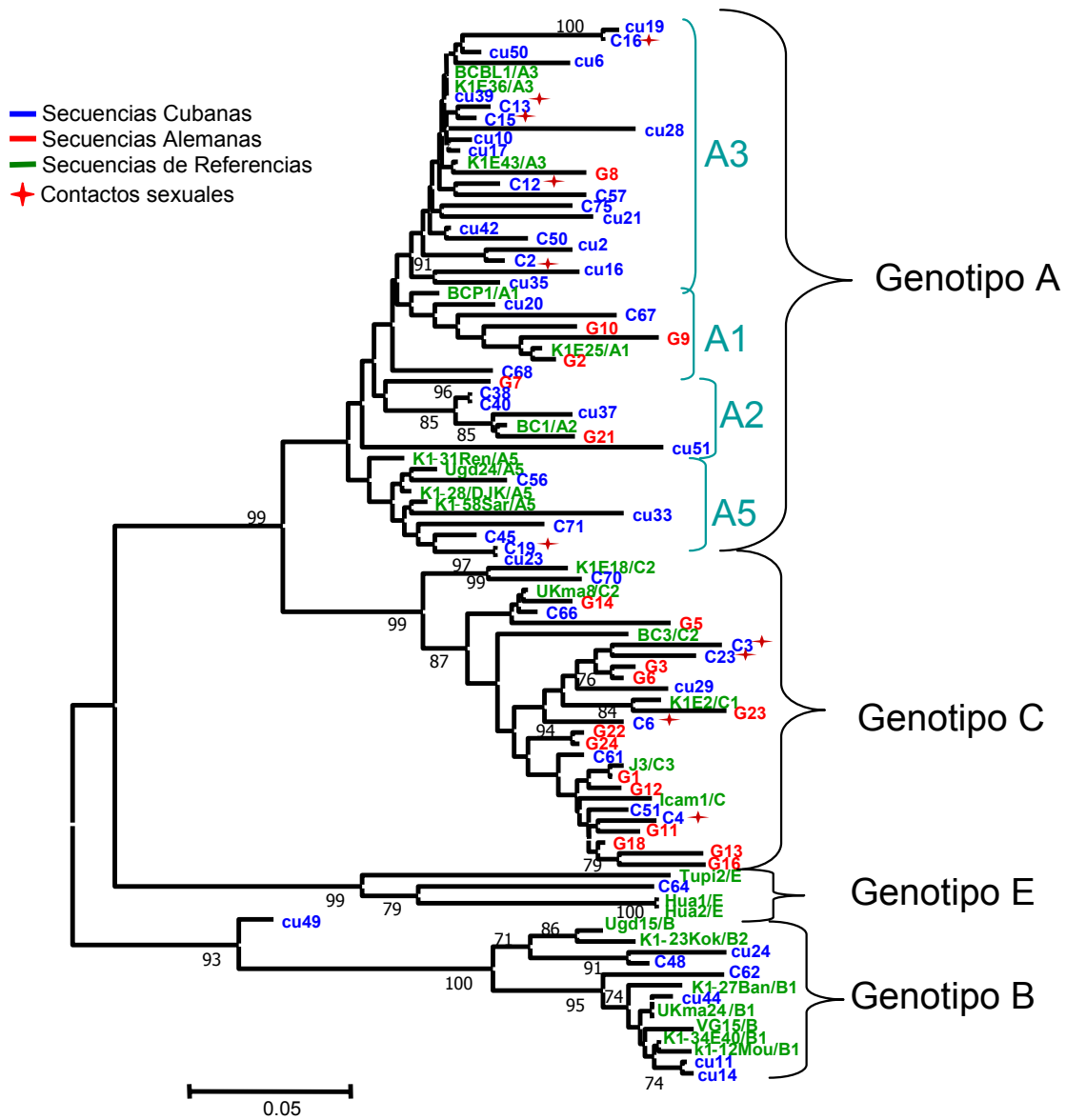


Figura 21. Árbol filogenético obtenido con el método de NJ (distancia Tamura-Nei) para las 96 secuencias aminoacídicas de VHH8 analizadas. **A1, A2, A3 y A5:** subtipos del Genotipo A del VHH8.

Dentro del genotipo B debemos destacar que se encontraron las dos secuencias de VHH8 que correspondían a dos pacientes heterosexuales que se habían infectado con VIH en África (Cu44 y Cu49), lo cual se corresponde con los genotipos que se han descrito que circulan en este continente, lo que sugiere que estos pacientes se pudieran haberse infectado a la misma vez con el VHH8. Esta gran variedad de genotipos,

incluyendo la presencia de los B y A5 solamente reportados anteriormente en África y la del genotipo E que recientemente se había descrito en amerindios de Brasil y Ecuador (Biggar y cols., 2000; Withby y cols., 2004), son muy divergentes comparados con otros reportes de Meng y colaboradores (Meng y cols., 2001) en pacientes de Argentina donde se reportan los genotipos A y C como los más frecuentes, o los estudios previos realizados en Estados Unidos y Europa (Zong y cols., 1999; Lacoste y cols., 2000c; Kadyrova y cols., 2003) en los que igualmente encuentran los genotipos A y C en todas las secuencias analizadas. Hasta este momento, los genotipos B y A5 sólo se habían reportado en individuos africanos o de origen africano (Lacoste y cols., 2000c; Kakoola y cols., 2001; Treurnicht y cols., 2002; Zong y cols., 2002), por lo que nuestros resultados podrían aportar nuevos datos a la epidemiología del VHH8. Debemos señalar que no se encontró asociación alguna entre el color de la piel y los genotipos o subtipos virales en los pacientes cubanos.

Publicaciones más recientes nos han proporcionado datos adicionales de genotipos de HASK en América del Sur. Lacoste y colaboradores (Lacoste y cols., 2000c), reportaron cinco secuencias de VHH8 de Guyana Francesa, y la mayoría de ellas fueron caracterizadas como A5 ó B. Estos resultados apoyan nuestros hallazgos, ya que esta Isla a pesar de pertenecer a Suramérica, se encuentra poblada en su mayoría por personas de origen africano.

Entonces, cabría preguntar, ¿qué ha conducido a esta diversidad de genotipos y subtipos en los pacientes cubanos infectados con el VHH8?

La población cubana actual se originó de una mezcla de diferentes grupos étnicos, pero principalmente de los europeos que comenzaron a arribar a la isla desde 1492 y la población negra que fue traída a través de la trata de esclavos de África durante los siglos XVI al XVIII (Guanche, 1996). La población nativa fue casi totalmente extinguida durante ese tiempo (Guerra, 1971). Por ello, asumimos que los genotipos A y C podrían haber sido introducidos en Cuba a través de los inmigrantes europeos, mientras que el genotipo B y el subtipo A5 podrían haber sido portados por los africanos traídos a Cuba como esclavos o más recientemente, por los cubanos internacionalistas que han viajado a África. El genotipo E podría haber estado circulando en Cuba entre la población nativa,

pero también podría haberse introducido por inmigrantes de Latinoamérica. Este origen diverso de composición étnica podría explicar el amplio rango de genotipos y la carencia de relación entre la raza y los genotipos en la población cubana. No obstante, a pesar de la variedad de genotipos, el A es el más prevalente, no sólo en Cuba, sino mundialmente, sugiriendo que el genotipo A pudiera haber evolucionado para lograr una transmisión más eficiente.

Por otro lado, como se muestran en las figuras 20, 21 y 23, ambos pacientes con dos muestras tanto cubanos (C38 y C40) como alemanes (G22 y G24) mostraron secuencias de VHH8 muy similares entre ellas, a pesar que dichas muestras fueron tomadas en diferentes intervalos de tiempo y de diferentes lesiones. Las secuencias de VHH8 cubanas mostraron un 100% de similitud, mientras que las alemanas mostraron un solo cambio de aa (N vs T) en la posición 68. Estos resultados concuerdan con reportes previos de Zong y colaboradores donde se sugiere que dentro del mismo individuo, no debe haber, o habría muy pocos cambios evolutivos del VHH8 a lo largo del tiempo (Zong y cols., 1999 y 2002).

En este trabajo y acorde a los datos epidemiológicos obtenidos, se tuvo la oportunidad de obtener un resultado único, ya que se realizó el análisis de las secuencias virales del gen ORFK1 del VHH8 de tres parejas de secuencias nt y aa obtenidas a partir de pacientes con SK y de sus contacto sexuales asintomáticos [C19 y C45 (A5); C4 y C51 (C); C12 y C57 (A3)].

Como se puede observar en la figura 22, las secuencias aa conservaron no sólo el mismo genotipo sino que además mantienen el mismo subtipo, a pesar de que se observan algunos cambios menores principalmente entre las muestras clasificadas como A3; además este subtipo es el que ha mostrado una mayor variabilidad de manera general. Este hallazgo permite suponer que el virus es bastante estable y que sólo se observan pequeños cambios cuando el mismo pasa de un individuo a otro. Existen algunos reportes que sugieren la estabilidad de las secuencias de K1 durante la vida o en infecciones secuenciales (Meng y cols., 1999; Zong y cols., 2002.). Otros sugieren fuertemente que la transmisión horizontal debe ser evidenciada por la existencia de secuencias idénticas o con pocos cambios aminoacídicos entre las variantes (Zong y

cols., 1999). Hasta ahora no se había corroborado esta hipótesis con casos clínicos, por lo que estos resultados permiten apoyar esta teoría.

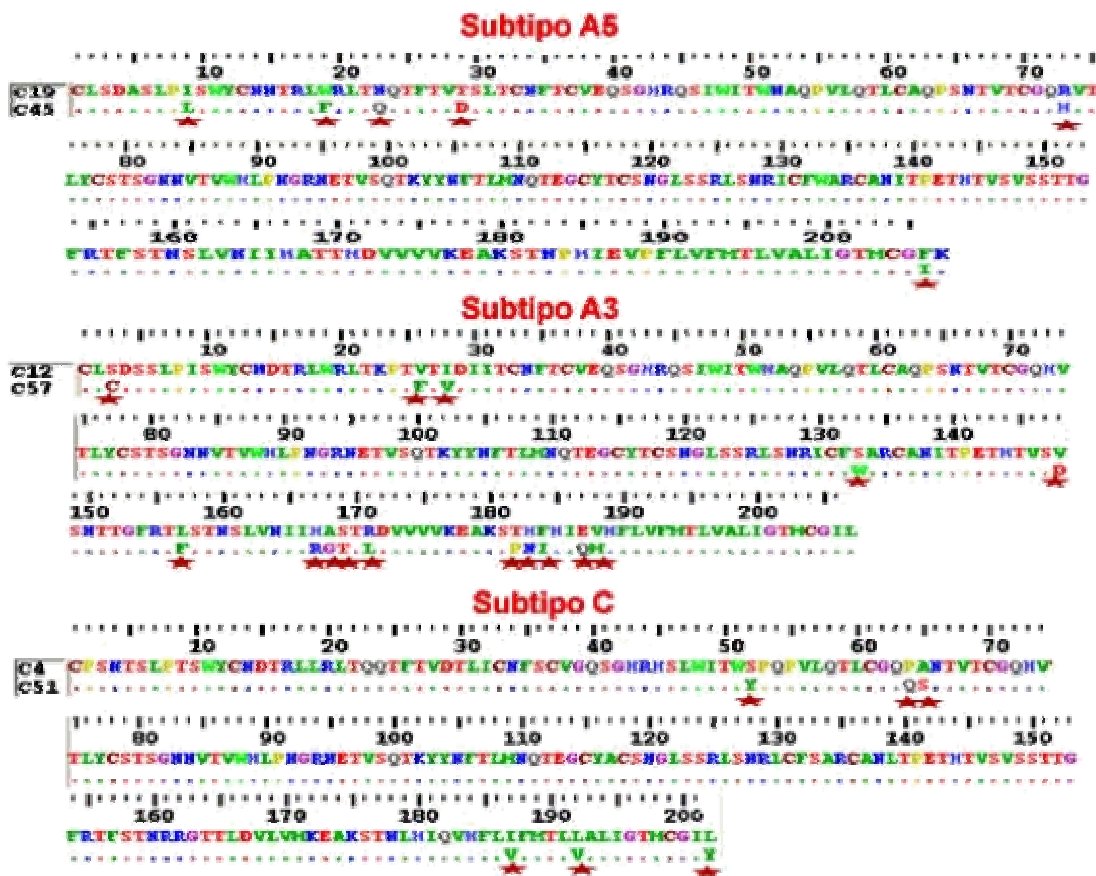


Figura 22. Secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia nucleotídica del gen ORFK1 del VHH8, obtenida de tres parejas de pacientes con SK y contacto sexual asintomático.

★ Indica los sitios con cambios en la secuencia de aminoácidos.

IV.3.4 Genotipos, Subtipos, Variaciones en las regiones de la secuencia K1 y Relevancia Funcional

En previos estudios, Zong y colaboradores han demostrado que la región amino y carboxilo terminal de la proteína K1 en los genotipos A y C son altamente conservadas, especialmente en el extremo citoplasmático de la proteína, donde se encuentra la región ITAM. Por otro lado, el dominio extracelular, particularmente las RV1 y RV2 muestran hasta un 60% de diversidad a nivel aminoacídico. (Zong y cols., 1999).

Para analizar las variaciones de las secuencias en las dos regiones variables de las muestras cubanas y alemanas, tanto de pacientes con SK como de los individuos asintomáticos infectados, se hizo la comparación de las 69 secuencias aa deducidas a

partir de las secuencias nt del gen ORFK1 para cada genotipo. Todas las secuencias resultaron ser diferentes unas de otras, con la excepción de las muestras obtenidas de los mismos individuos (C38-C40 y G22-G24).

Todas las secuencias exhibieron entre ellas desde 0 hasta 23% de divergencia nt y desde 0 a 33% a nivel aa mediante el análisis empleando la matriz de distancia de Tamura-Nei. Las variaciones aa de K1 fueron significativamente mayores que las que se observaron para las secuencias nt, lo que indica que la variabilidad es conducida por selección positiva (Zong y cols., 1999 y 2002). De manera general, las secuencias de las muestras alemanas se comportaron mucho más conservadas mostrando hasta un 15% de divergencia a nivel aa entre ellas, mientras que las cubanas se comportaron más distantes entre sí mostrando hasta un 33% de divergencia a nivel aa.

Debido a que el gen ORFK1 tiene un gran número de sustituciones nt que en su mayoría conducen a mutaciones aa, en toda la literatura consultada el análisis molecular del VHH8 se basa en las secuencias aa (Poole y cols., 1999; Zong y cols., 1999 y 2002; Lacoste y cols., 2000c y d), por lo que en este estudio discutimos principalmente los cambios aminoacídicos y no los nucleotídicos. (Figura 23).

Mientras que todas las muestras incluidas en el genotipo C exhibieron la típica deleción de 5 aa en las posiciones 201 a la 205, como se ha descrito por varios autores (Cook y cols., 1999; Zong y cols., 1999), las secuencias correspondientes al genotipo A de la proteína K1 revelaron numerosas mutaciones en ambas RV (Figura 23).

Los subtipos A1, A2 y A5 del genotipo A compartieron las mutaciones puntuales, mientras que las secuencias del subtipo A3 se distribuyeron con un patrón esporádico. Sin embargo, las variantes B mostraron sólo 4 mutaciones aa en las regiones variables y algunos cambios dentro de las regiones conservadas.

Las secuencias incluidas en el genotipo A, mostraron varios sitios de inserciones y deleciones específicos a lo largo de la región variable, principalmente en la RV2. La muestra Cu51 tiene en la secuencia de la proteína K1 dos inserciones de aa en las posiciones 200 y 201 y dos deleciones en las posiciones 234 y 235. Dos variantes de K1 (Cu20 y Cu28) revelaron 4 deleciones aa en diferentes posiciones 210-213 y 220-223, respectivamente. Por otro lado la secuencia aa del VHH8 de la muestra Cu28 mostró

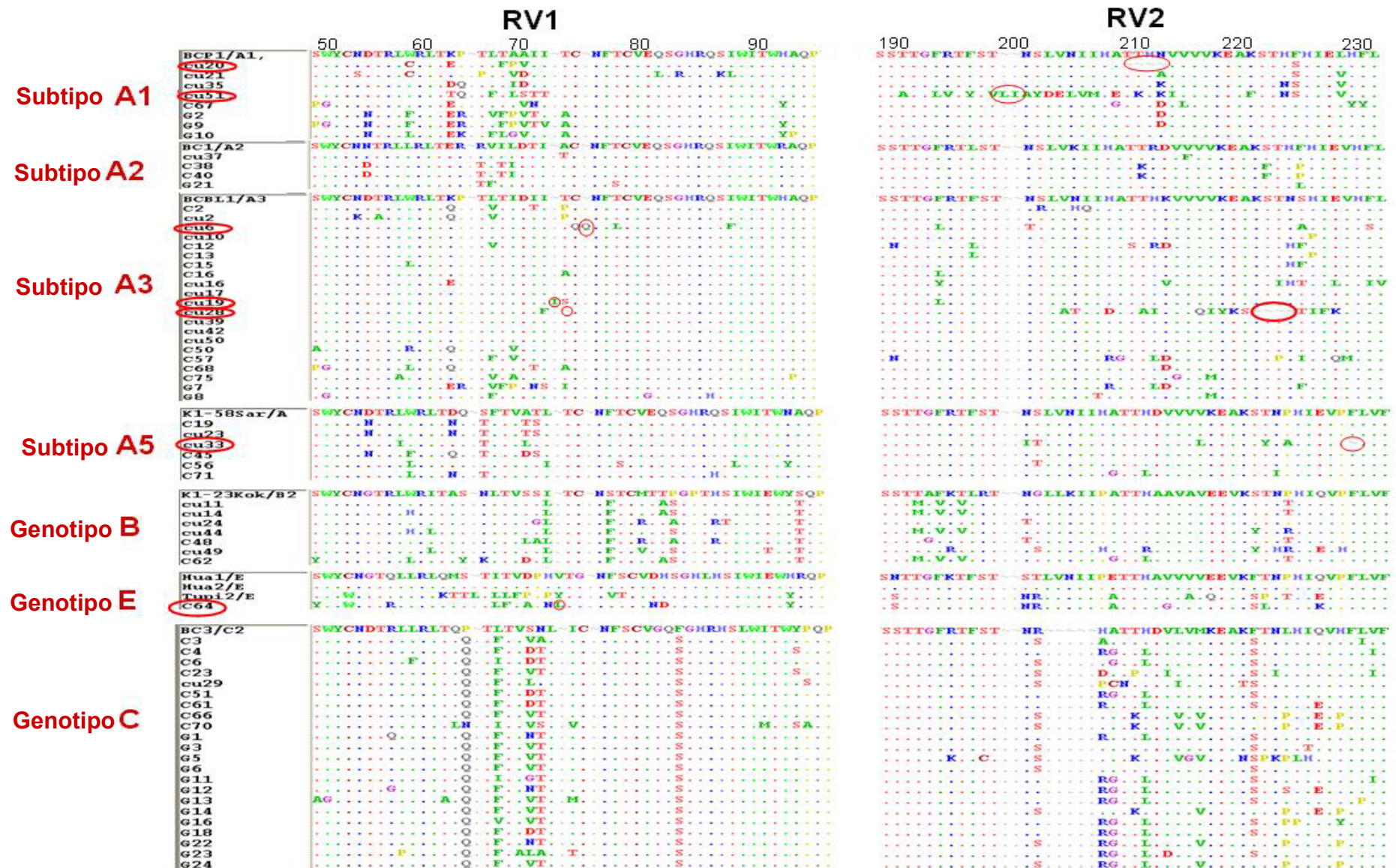


Figura 23. Secuencias aminoácidas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas del gen ORF K1 de las 69 secuencias analizadas. **RV**: regiones variables. **RV1** aa 50-94, **RV2** aa 190-230. Los puntos indican secuencias aminoácidas similares y las letras indican cambios aminoácídicos. Los espacios en blanco indican deleciones/inserciones. Las secuencias que tienen deleciones e inserciones se encuentran circuladas en rojo, al igual que los sitios donde aparecen las mismas.

una delección adicional en la posición 74, mientras que otras dos variantes (Cu6 y Cu19) mostraron una inserción en las posiciones 76 y 73, respectivamente. La secuencia Cu 33 mostró dos delecciones en las posiciones 229 y 267. Por otra parte, en la secuencia C64 se observó una inserción en la posición 73, la cuál es característica del genotipo E (Figura 23).

Ninguna de las variantes K1 del genotipo B mostraron alguna delección/ inserción. Lacoste y colaboradores (Lacoste y cols., 2000 b y c) han reportado que estas delecciones en las regiones variables aparecen en algunas secuencias de K1 y que este patrón diverso de inserción/delección pudiera ser el resultado de un fácil acceso a rearrreglos genómicos en las RV donde no hay estructura secundaria. La hipermutabilidad en el ectodominio de K1 probablemente refleja la presión inmunológica ejercida en células infectadas que expresan esta proteína. Por otro lado, se debe tener en cuenta lo planteado por otros autores (McGeoch y Davison, 1999) que consideran que las extremas variaciones en el gen K1 pudieran reflejar adaptaciones recientes del VHH8 a un nuevo huésped acompañado de la diseminación más reciente antes y durante la epidemia de SIDA. No obstante, se necesitan estudios más profundos como el estudio de otros genes variables (ORFK15) para confirmar esta hipótesis.

Al comparar las RV entre las secuencias del VHH8 de las muestras alemanas y cubanas, observamos que en el subtipo A1, en la RV1, las secuencias de las muestras alemanas (G2, G9 y G10) mostraron un patrón muy similar entre ellas pero diferente de las cubanas. Por otro lado, para el genotipo C, en la posición 68, el aminoácido aspártico (D) apareció más frecuentemente entre las muestras cubanas (4 de 9, en las cubanas y sólo en 1 de las 13 alemanas), mientras que en las alemanas esta posición estuvo sustituida por residuos no polares, o polares no cargados.

De acuerdo a algunos estudios estructurales de la proteína K1, empleando Acs monoclonales (Lee y cols., 2000, 2002 y 2003) se describe que las RV1 están involucradas en la movilización del calcio, por lo que se deben realizar estudios más profundos de estos cambios, con el fin de determinar si la movilización de calcio pudiera verse afectada por estos cambios aminoacídicos.

El hecho de que la señal de la proteína K1 sea estimulada eficientemente por Acs que reaccionan con los aminoácidos 98 a 125 de dicha proteína, indican la importancia de la estructura o conformación para la función de K1 (Lee y cols., 2003). Se ha reportado previamente que los residuos de cisteína (C) y los sitios de glicosilación son dos factores importantes para mantener la estructura y conformación de las proteínas, y que un cambio en estas regiones, con frecuencia afecta la función de las mismas (Zong y cols., 1999; Lacoste y cols., 2000b). En las 15 secuencias completas del gen ORFK1 analizadas, 16 de los 18 residuos de cisteína se conservaron completamente (datos no mostrados). Además, los 8 sitios potenciales de N (Asparagina) glicosilación (NxS/T) (S: Serina, T: Treonina) del dominio extracelular de K1 de forma general se mantuvieron conservados (Tabla 9), no obstante, también se vieron algunas mutaciones puntuales.

Por ejemplo, la mayoría de los subtipos A perdieron un sitio de glicosilación N en el aminoácido 43 cambiando la asparagina (N) a ácido aspártico (D) (NxS->DxS), mientras que el genotipo B ganó un sitio extra en la posición 64 cambiando treonina (T) por asparagina (TxT->NxT) (Tabla 9). Teniendo en cuenta que la mayoría de los residuos de cisteína y los sitios de glicosilación se encuentran en las regiones conservadas y los patrones de glicosilación son únicos entre cada genotipo y subtipo, la estructura adecuada pudiera ser un importante factor para la función y/o sobrevivencia del virus. Por ello, la correlación entre los subtipos de K1 y los patrones de glicosilación pudieran proporcionar información importante para esclarecer la patogenicidad de la infección por el VHH8.

Tabla 9. Sitios potenciales de glicosilación NxS/T en los diferentes genotipos y subtipos del de la proteína K1 del VHH8. 2004.

Posición aa.	43	53	64	73	123	134	144	150	178
Genotipo/subtipo									
A1 (1), A5 (1)	x	x	-	x	x	x	x	x	x
A1- A5 (8)	-	x	-	x	x	x	x	x	x
B (4)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C (1)	x	x	-	x	x	x	x	x	x
D (SR)	-	x	-	x	x	-	x	x	x

Los números están en correspondencia con las posiciones aminoacídicas en el dominio extracelular de las secuencias K1 para los sitios de predicción de glicosilación. Entre paréntesis, en la primera columna, el número de secuencias que mostraron cada patrón de glicosilación. A1-A5: patrón de glicosilación detectado en 8 secuencias incluidas en todos los subtipos del genotipo A.

Abreviaturas: N: asparagina; X: sitios potenciales de glicosilación (NxS/T); -: sitios mutados, donde NxS/T está ausente; aa: aminoácido. SR: secuencia de referencia del VHH8 obtenida del GenBank.

Fuente: Laboratorio de ETS, Departamento de Virología, IPK.

Además de los dos residuos de tirosina (Y₁ y Y₂) en la secuencia terminal ITAM, algunas variantes de la proteína K1 contienen un residuo adicional a la derecha justo después de la primera tirosina (Y₃) (-Y₁Y₂SLxxxxxxY₃TPQ-). Entre las 15 muestras que logramos secuenciar íntegramente, hemos encontrado dos variantes de K1 donde la segunda tirosina (Y₂) en la región de ITAM fue cambiada de -Y₁Y₂SL- a -Y₁FSL- y -Y₁HSL-, respectivamente. Debido a que la segunda tirosina tiene una función única en la transducción mediada por la señal de K1 los estudios de estos dos clones pudieran proveer algunas ideas para la mejor comprensión de las funciones de esta proteína (**Anexo II:** listado de aminoácidos con su símbolo correspondiente).

En resumen, se presenta el primer estudio de epidemiología molecular de VHH8 de pacientes cubanos y alemanes con SK, así como de contactos sexuales asintomáticos. Se encontró una alta diversidad de genotipos y subtipos entre las muestras cubanas (A1, A2, A3, A5, B, C2, C3 y E), pero sin ninguna relación con un grupo étnico específico o con la progresión de la enfermedad, en contraste las muestras de pacientes alemanes fueron mucho más conservadas.

Los datos reportados en este estudio indican que el HASK ó VHH8 ha sido diseminado a Cuba, y probablemente también al Caribe y Suramérica, a partir de diferentes orígenes geográficos (África y Europa) después del encuentro de varias culturas, y el genotipo E pudiera haber estado circulando antes de la colonización entre las poblaciones de aborígenes o podría haberse introducido posteriormente por inmigrantes de América Latina. Por otro lado, los genotipos africanos también podrían haberse introducido más recientemente desde África de la misma forma que ocurrió con el VIH.

IV.4 Determinación de la carga viral del VHH8 en pacientes con SK y en contactos sexuales asintomáticos

IV.4.1 Diseño del PCR en Tiempo Real

Se diseñó un PCR en Tiempo Real para determinar carga viral del VHH8, empleando para ello un juego de oligonucleótidos y sonda que amplifican y detectan la señal de amplificación dentro de una zona conservada del gen ORFK1 (nt 386 al 346) del VHH8. Las secuencias de los oligonucleótidos y sondas diseñadas en el estudio, fueron reconocidas por el 100% de las secuencias del gen ORFK1 del VHH8 disponibles en el GenBank, sin compartir homología con ninguna otra secuencia conocida.

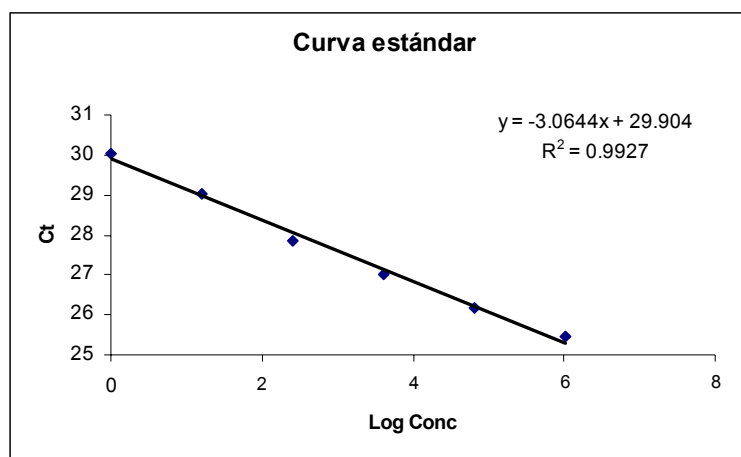


Figura 24. Curva estándar obtenida con el control positivo empleado en la estandarización del sistema (línea celular BC-3). Diluciones seriadas con base 10 desde 10^6 hasta 10 copias de ADN del HASK por reacción. Las amplificaciones se repitieron tres veces para cada dilución. La línea fue obtenida mediante análisis de regresión lineal ($R^2 = 0.9927$).

La habilidad de esta prueba de detectar y cuantificar el ADN del VHH8 en células humanas fue probado inicialmente mediante la dilución seriada del ADN_g extraído de la línea celular BC3 (rango desde 25×10^3 células/ μ L hasta 0.25 células/ μ L). Se confeccionó una curva estándar con los valores umbrales obtenidos (C_T), contra el logaritmo del número de copias (Figura 24). La cuantificación del VHH8 probó ser lineal en un amplio rango (desde 10 hasta 10^6 copias). El porcentaje de detección fue de un 100% cuando el número de copias se encontraba por encima de 10, detectándose la señal de manera homogénea en las tres réplicas de cada dilución. El rendimiento de la amplificación y los porcentajes de detección fueron comparables cuando el ADN_g de la línea celular BC-3 fue sometido a la amplificación del gen de la β globina humana (datos no mostrados). Por ello se consideró que la sensibilidad de nuestro ensayo es comparable al obtenido con otros

ensayos de PCR en Tiempo Real usando como blanco diferentes genes dentro del HASK (Campbell y cols., 2000; Lallemand y cols., 2000; Campbell y cols., 2003).

IV.4.2 Muestras de pacientes

En este trabajo, se reporta por primera vez a nivel mundial, la detección de VHH8 en contactos sexuales de pacientes con SK. Las muestras de dichos contactos fueron analizadas por tres técnicas, una de ellas serológica (IFI anti-LANA, acápite **IV.1**) y dos moleculares (PCR anidado del gen ORFK1, acápite **IV.3** y PCR en Tiempo Real).

Al analizar las muestras clínicas, 15 de las 22 (68.1%) CMSP de los contactos sexuales asintomáticos de pacientes con SK, resultaron positivas con la técnica de PCR en Tiempo Real, de ellas, 13 y 11 resultaron también positivas mediante la detección de Acs anti-LANA y el PCR anidado ORFK1, respectivamente. Sólo dos muestras (C1 y C16) resultaron positivas únicamente por el PCR en Tiempo Real, ambas con un número de copias muy bajas (~10 copias/ μ g) por lo que difícilmente podría ser detectado por un PCR convencional. Por otro lado, la muestra C21 tenía una concentración de ADN_g muy baja, detectada por la amplificación del gen de β globina humana. Sin embargo, el número de copias del VHH8 era de más de 20 000 copias, debido a ello, probablemente el PCR anidado tampoco fue capaz de detectarlo, no obstante, este caso presentó Acs al VHH8.

Al comparar la IFI con respecto al PCR en Tiempo Real en una tabla de contingencia, considerando a la técnica de detección de Acs anti-LANA como la técnica de oro para diagnosticar la infección con el VHH8, se obtuvieron los siguientes resultados: S 100%, E 77%, VPP 86% y VPN 100% (Tabla 10).

Tabla 10. Tabla de contingencia donde se comparan los resultados obtenidos con el PCR en tiempo Real con el de la IFI anti-LANA de los 22 contactos sexuales asintomáticos de pacientes con SK. 2004.

		IFI Acs anti-LANA	
		+	-
PCR Tiempo Real	+	13	2
	-	0	7

Fuente: Laboratorio de ETS. Departamento de Virología, IPK.

Mientras que al compararse la técnica de oro con la PCR anidada del gen ORFK1 obtuvimos que la S era de un 84%, la E de un 100%; el VPP de un 100% y VPN de un 70% (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de contingencia donde se comparan los resultados obtenidos con el PCR anidado para el gen ORFK1 con la IFI anti-LANA en los 22 contactos sexuales asintomáticos de pacientes con SK. 2004.

		IFI Acs anti-LANA	
		+	-
PCR anidado K1	+	11	0
	-	2	9

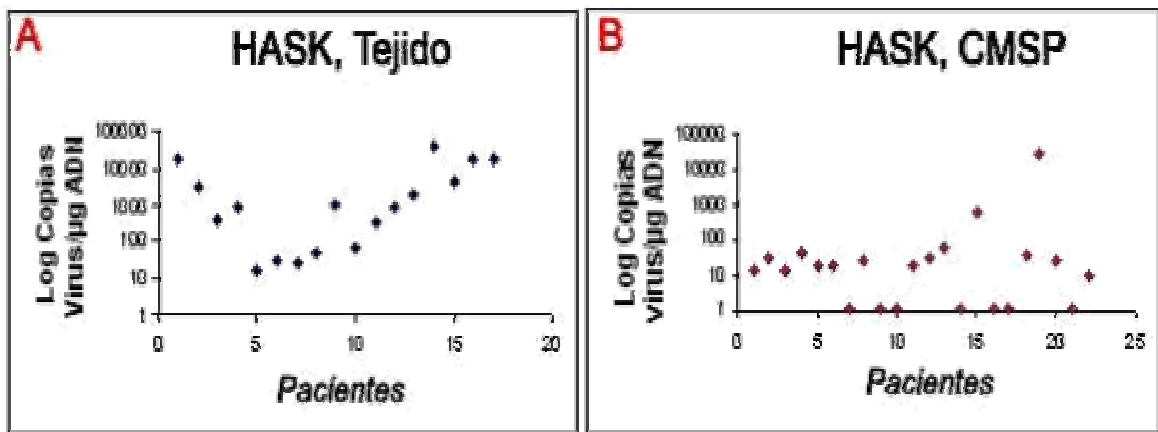
Fuente: Laboratorio de ETS. Departamento de Virología, IPK.

Muchos métodos de diagnóstico molecular empleados en la actualidad en microbiología, incluyen la amplificación bacteriana o viral de ácidos nucleicos. La amplificación del ADN mediante PCR es extraordinariamente eficiente, ya que incluso un solo organismo puede ser detectado, producto de ello, existen razones poderosas para pensar que las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos pueden ser más sensibles que los métodos convencionales (Vaneechoutte y Van Eldere, 1997; McAdam, 2000).

Actualmente, existen muchas dificultades al evaluar las nuevas pruebas que se espera que sean altamente sensibles. En el caso de HASK, no existe hoy en día un método considerado técnica de Oro, no obstante, la detección de Acs ya sea por ELISA o por IFI, son los métodos que más se han empleado para determinar infección por el HASK (Gao y cols., 1996a). Estas técnicas, bajo las condiciones ideales pueden detectar hasta un 90% de los pacientes infectados. Las pruebas serológicas habitualmente constituyen métodos más sensibles que los PCR cualitativos para el diagnóstico del VHH8 especialmente en individuos asintomáticos. Sin embargo, con el uso de métodos cuantitativos como el PCR en Tiempo Real, el porcentaje de positividad se ha incrementado notablemente (Dupin y cols., 1997; Purvis y cols., 1997; Campbell y cols., 2003; Curreli y cols., 2003), obteniendo resultados variables desde más de un 20 y hasta

un 100%, dependiendo del método usado y de la población seleccionada para el estudio (Campbell y cols., 2000; Whitby y cols., 2004).

Las 17 muestras de tejido de lesiones de piel de pacientes con SK fueron detectadas positivas mediante PCR en Tiempo Real, mientras que ninguna de las CMSP de los controles negativos (trabajadores de laboratorio) resultó positiva a infección con el HASK. Cuando comparamos la carga viral de VHH8 entre los contactos sexuales asintomáticos de pacientes con SK con las obtenidas en tejidos de pacientes con SK, se observa claramente que la carga viral es mucho mayor en tejidos que en CMSP de individuos asintomáticos ($p < 0.05$) (Figuras 25A y 25B).



Figuras 25A y 25B. Logaritmo del número de copias/µg de ADN del HASK. En tejidos de pacientes con SK (24A) y en CMSP de individuos contactos sexuales asintomáticos infectados con el VHH8 (24B).

Fuente: Laboratorio de ETS. Departamento de Virología, IPK

Estos hallazgos coinciden con los resultados de otros estudios, empleando poblaciones de individuos asintomáticos y pacientes con SK, donde se detectó que la cantidad de ADN del VHH8 era directamente proporcional al estadio clínico del SK (Campbell y cols., 2000 y 2003; Boivin y cols., 2002).

En este estudio se comparó además la carga viral de VHH8 con la carga viral de VIH y con el conteo de células CD4 en los contactos sexuales asintomáticos de pacientes con SK. La cifra promedio del conteo de CD4 en los 22 pacientes analizados fue de 459.1 cels/mm³, mientras que la carga viral de VIH fue indetectable (por debajo de 100 copias/mL) en 11 pacientes y sólo 6 presentaron valores por encima de 1000 copias. El resto presentaba valores de carga viral de VIH entre 100 y 1000 copias/ mL. Sólo dos de

los 22 pacientes presentaron conteo de CD4 por debajo de 200 células, y coincidentemente estos dos pacientes tenían carga viral de VIH por encima de 10000 copias, además de elevado número de copias de VHH8 (24982 y 545, respectivamente). Excepto un paciente que tenía 160 copias/mL, todos los pacientes negativos al VHH8 tenían carga viral de VIH no detectable. Cinco casos con niveles no detectables de VIH y conteo de CD4 alrededor de 500 células mostraron bajo número de copias del HASK (10 a 100 copias). Al hacer el análisis de correlación no paramétrica por rangos de Spearman, encontramos que hubo una relación estadísticamente significativa entre la carga viral de VHH8 y el conteo de CD4 (rango -0.525, $p < 0.012$). Sin embargo a pesar de que los pacientes con carga viral indetectable al VHH8 también lo fueron al VIH en su mayoría, al hacer la correlación entre carga viral a VHH8 y a VIH no encontramos diferencias significativas (rango 0.293, $p > 0.05$). Estos resultados sugieren que los niveles de viremia del VHH8 en los contactos sexuales asintomáticos se asocian con otros marcadores de inmunosupresión en el paciente seropositivo al VIH como es el conteo de células CD4. Resultados similares se han encontrado en estudios de pacientes con SK, en los que se ha reportado asociación entre estos marcadores y el estadio en que se encuentra el SK (Tedeschi y cols., 2001). Por otra parte, Renwick y colaboradores, plantean que entre los pacientes seropositivos al VIH el riesgo para desarrollar SK depende del conteo de CD4 más que de la carga viral de VIH (Renwick y cols., 1998; Moore y Chang, 2001). La Tabla 12 muestra los resultados expuestos.

Tabla 12. Comparación de la carga viral al VHH8 con el conteo de CD4 y con la carga viral de VIH en los pacientes cubanos contactos sexuales de pacientes con SK. 2004.

Carga Viral VHH8 copias/ μ g	Conteo CD4 (célula/mm ³)		Carga viral de VIH (copias/ ml)		
	<200	>200	<100	100-1000	>1000
<10 (7 pacientes)	0	7	6	1	0
10-100 (13 pacientes)	0	13	5	4	4
100-1000 (1 paciente)	1	0	0	0	0
>1000 (1 paciente)	1	0	0	0	2

$P < 0.012$ al realizar análisis de correlación por rangos de Spearman entre Carga viral a VHH8 y conteo de células CD4.

Fuente: Laboratorio de ETS. Departamento de Virología, IPK.

Todos estos resultados muestran que el PCR en Tiempo Real pudiera representar una técnica muy efectiva para el diagnóstico temprano de infección con el VHH8 en pacientes que se encuentran en riesgo de desarrollar SK, y por otro lado podría servir como un indicador para comenzar la terapia antirretroviral combinada, aún antes de la aparición de las lesiones del SK, así como una prueba útil en el monitoreo de las respuesta a las terapias usadas para tratar el SK.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1. El estudio de seroprevalencia al VHH8 mostró que la infección por este virus es frecuente en individuos que viven con VIH, no así en la población de individuos seronegativos al VIH estudiada.

2. Basados en los elevados porcentos de infección con el VHH8, detectados al estudiar los contactos sexuales de pacientes con SK, podemos afirmar que el VHH8 es transmitido por contacto sexual, aunque el contacto a través de la saliva podría constituir otra de las vías de transmisión.

3. Las características clínicas y anatomopatológicas del SK en los pacientes cubanos mantienen un patrón similar al reportado mundialmente para el SK epidémico.

4. La caracterización molecular de las secuencias del VHH8, demostró una alta diversidad de genotipos y subtipos entre las muestras cubanas, así como de deleciones/inserciones, pero sin ninguna relación con un grupo étnico específico o con la progresión de la enfermedad.

5. La presencia de genotipos europeos, americanos y africanos entre las secuencias cubanas del VHH8 nos permite sugerir que el HASK ó VHH8 ha sido diseminado a Cuba, a partir de diferentes orígenes geográficos.

6. El PCR en Tiempo Real para el VHH8 mostró una alta sensibilidad como método para medir carga viral, por lo que representa una técnica muy efectiva para el diagnóstico temprano de infección con el VHH8, y para el seguimiento de pacientes.

7. La carga viral del VHH8 en pacientes infectados de manera asintomática es menor a la que aparece en el tejido de aquellos con SK, guardando relación con marcadores de inmunosupresión del individuo.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

- Hacer estudios serológicos en grupos más amplios de población cubana, incluyendo diferentes rangos de edades y diferentes grupos de riesgos.
- Profundizar en la caracterización molecular del VHH8 de pacientes cubanos, empleando otro gen variable (gen K15).
- Estudiar desde el punto de vista funcional si existe diferencias entre los diferentes genotipos y subtipos detectados y la eficiencia de infección *in vitro*.
- Hacer estudios más amplios de carga viral, así como evolucionar la carga viral VHH8 en aquellos individuos que se detecten infectados y los que se encuentren bajo tratamiento.
- Detectar la presencia de VHH8 en otros fluidos corporales (saliva, secreciones cervicales, semen) en pacientes con SK y en individuos asintomáticos y cuantificar la carga viral en dichos fluidos.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman AB: The patch stage of Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol* 1979;1:165-172
- Akira S, Kishimoto T. The evidence for interleukin-6 as an autocrine growth factor in malignancy. *Semin Cancer Biol* 1992;3:17-26.
- Albrecht JC, Nicholas J, Biller D, Cameron KR, Biesinger C, Neuman S, et al. Primary structure of the *Herpesvirus saimiri* genome. *J Virol* 1992;66:5047-5058.
- Ambroziak JA, Blackbourn DJ, Herndier RG, Glogau JH, Gullet RA, Mc Donald ET, et al. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* 1995;268:582-583
- Andreoni M, El-Sawaf G, Rezza G. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: Evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:465-469.
- Aoki Y, Tosato G. Neoplastic conditions in the context of HIV-1 infection. *Curr HIV Res.* 2004;2:343-349.
- Archibald CP, Schechter MT, Craib KJ. Risk factors for Kaposi's sarcoma in the Vancouver Lymphadenopathy-AIDS Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;3[Suppl]:S18-23.
- Ariyoshi K, van der Loeff M, Cook P, Whitby D, Corrah J, Jaffar S, et al. Kaposi's sarcoma in the Gambia, West Africa is less frequent in human immunodeficiency virus type 2 than in human immunodeficiency virus type 1 infection despite a high prevalence of human herpesvirus 8. *J Hum Virol* 1998;1:193-199.
- Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* 1996;88:2648-2654.
- Athale UM, Patil PS, Chintu C, Elem B. Influence of HIV epidemic on the Incidence of Kaposi's sarcoma in Zambian children. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;8:96-100.
- Avery RK. Prophylactic strategies before solid-organ transplantation. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17:353-356.
- Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 1999;284:641-644.
- Ballestas ME, Kaye KM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *J Virol* 2001;75:3250-3258.
- Bassett MT, Chokunonga E, Mauchaza B. Cancer in the African population of Harare, Zimbabwe, 1990-1992. *Int J Cancer* 1995;63:29-36.
- Beral V, Bull D, Jaffe H, Evans B, Gill N, Tillet H, et al. Is risk of Kaposi's sarcoma in AIDS patients in Britain increased if sexual partners came from United States or Africa? *Br Med J* 1991;302:624-625.

- Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: A sexually transmitted infection? *Lancet* 1990;335:123–128.
- Beral V. Epidemiology of Kaposi's Sarcoma. In: Beral V, Jaffe HW & Weiss RA eds. *Cancer, HIV and AIDS*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1991.p5-22.
- Berend KR, Jung JU, Boyle TJ. Phenotypic and functional consequences of herpesvirus saimiri infection of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1993;67:6317–6321.
- Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 2000, 181:1562-1568.
- Blackbourn DJ, Levy JA. Human herpesvirus 8 in semen and prostate. *AIDS* 1997;11:249–250.
- Blasig C, Zietz C, Haar B. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol* 1997;71:7963–7968.
- Blauvelt A, Sei S, Cook PM. Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States. *J Infect Dis* 1997;176:771–774.
- Boivin G, Cote S, Cloutier N, Abed Y, Maguigad M, Routy,JP. Quantification of human herpesvirus 8 by real-time PCR in blood fractions of AIDS patients with Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. *J Med Virol* 2002;68:399-403.
- Boralevi F, Masquelier B, Denayrolles M, Dupon M, Pellegrin JL, Ragnaud JM and Fleury HJ. Study of human herpesvirus 8 (HHV-8) variants from Kaposi's sarcoma in France: Is HHV-8 subtype A responsible for more aggressive tumors? *J Infect Dis* 1998;178:1546-1547.
- Boshoff C, Gao SJ, Healy LE. Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice. *Blood* 1998;91:1671–1679.
- Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med* 1995b;1:1274–1278.
- Boshoff C, Talbot S, Kennedy M, O'Leary J, Schulz T y Chang Y. HHV8 and skin cancers in immunosuppressed patients (letter). *Lancet* 1996;347:338-339.
- Boshoff C, Whitby D, Hatzioannou T, Fisher C, van der Walt J, Hatzakis A, Weiss R and Schulz T. Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus in HIV negative Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995a, 345:1043-1044.
- Bourbouli D, Whitby D, Boshoff C. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *JAMA* 1998;280:31–32.
- Brandt SJ, Bodine DM, Dunbar CE, Nienhuis AW. Retroviral-mediated transfer of interleukin-6 into hematopoietic cells of mice results in a syndrome resembling Castleman's disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;166:37–41.
- Brodreaux AA, Smith LL, Cosby CD. Intralesional vinblastine for cutaneous Kaposi's sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical trial to evaluate efficacy and discomfort associated with infection. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:61-65.

- Calabro ML, Sheldon J, Favero A, Simpson GR, Fiore JR, Gomes E, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J Hum Virol* 1998;1:207–213.
- Campbell TB, Borok M, White IE, Gudza I, Ndemera B, Taziwa A, et al. Relationship of Kaposi sarcoma (KS)-associated herpesvirus viremia and KS disease in Zimbabwe. *Clin Infect Dis* 2003;36: 1144-1151.
- Campbell TB, Borok M, Gwanzura L, MaWhinney S, White I E, Ndemera B, et al. Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage. *AIDS* 2000;14:2109-2116.
- Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 2001;344:637–643.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnick PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8790–8794.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morb Mortal Wkly Rep* 1992;41:1–19.
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*. 1995a, 332:1186-1191.
- Cesarman E, Moore PS, Rao PH, Rao PH, Inghirami G, Knowles DM and Chang Y. In vitro establishment and characterization of two AIDS-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood* 1995b;86:2708–2714.
- Chandran BC, Bloomer SR, Chan L. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology* 1998;249:140–149.
- Chang Y, Cesarman E, Pessin M, Lee F, Culpepper J, Knowles D, Moore P. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;265:1865-1869.
- Chatlynne LG, Lapps W, Handy M, Huang YR, Masood R, Hamilton AS, et al. Detection and titration of human herpesvirus-8-specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 92:53–58.
- Collandre H, Ferris S, Grau O. Kaposi's sarcoma and new herpesvirus. *Lancet* 1995;345:1043.
- Cook PJ, Burkitt DP. Cancer in Africa. *Br Med Bull* 1971;27:14–20.
- Cook PM, Whitby D, Calabro ML, Luppi M, Kakoola DN, Hjalgrim H, et al. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. International Collaborative Group. *AIDS* 1999;13:1165-1176.
- Cook-Mozaffari P, Newton R, Beral V, Burkitt DP. The geographical distribution of Kaposi's sarcoma and of lymphomas in Africa before the AIDS epidemic. *Br J Cancer* 1998;78:1521–1528.
- Corbellino M, Bestetti G, Poirel L. Is human herpesvirus 8 fairly prevalent among healthy subjects in Italy? *J Infect Dis* 1996;174:668-670.

- Curreli F, Robles MA, Friedman-Kien AE, Flore O. Detection and quantitation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) by a single competitive-quantitative polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2003;107:261-267.
- de Lellis L, Fabris M, Cassai E. Herpesvirus-like DNA sequences in non-AIDS Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 1995;172:1605-1607.
- de Sanjose S, Marshall V, Sola J, Palacio V, Almirall R, Goedert J J, et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in sex workers and women from the general population in Spain. *Int J Cancer* 2002;98:155-158.
- Delabesse E, Oksenhendler E, Lebbe. Molecular analysis of clonality in Kaposi's sarcoma. *J Clin Pathol* 1997;50:664-668.
- Desrosiers RC, Sasseville VG, Czajak SC. A herpesvirus of rhesus monkeys related to the human Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 1997;71:9764-9769.
- Diamond C, Brodie SJ, Krieger JN. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 1998;72:6223-6227.
- Dictor M. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma. *Semin Cutan Med Surg* 1997;16:181-187.
- Dore GJ, Li Y, Grulich AE. Declining incidence and later occurrence of Kaposi's sarcoma among persons with AIDS in Australia: The Australian AIDS cohort. *AIDS* 1996;10:1401-1406.
- Drexler HG, Uphoff CC, Gaidano G, Carbone A. Lymphoma cell lines: In vitromodels for the study of HHV-8+- primary effusion lymphomas (body cavity-based lymphomas). *Leukemia* 1998;12:1507-1517.
- Duboise SM, Guo J, Czajak S. STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *Mol Cell Biol* 1998;18:5219-5228.
- Dukers NH, Renwick N, Prins M. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am J Epidemiol* 2000;151:213-224.
- Dupin N, Fisher C, Kellam P. Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4546-4551.
- Dupin N, Grandadam M, Calvez V, Gorin J, Aubin JT, Havard S, et al. Herpesvirus-like DNA in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;345:761-762.
- Dupin N, Masquelier B, Cazorla C. Acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 DNA detection in serial peripheral blood mononuclear cell samples. *Res Virol* 1997;148:417-425.
- Ensoli B, Barillari G, Gallo RC. Pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991;5:281-295.
- Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Gallo R. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* 1994;371:674-680.
- Ensoli B, Monini P and Sgadari C. Pathogenesis and cell biology of Kaposi's Sarcoma. En: Angus G. Dalgleish & Robin A Weiss eds. HIV and the New Viruses. *London Academic Press*; 1999:385-412.

- Ensoli B, Sturzl M. Kaposi's sarcoma: A result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:63–83.
- Eurogentec. Quantitative and Qualitative PCR Technology [review and catalog]. 2002. Available online at www.eurogentec.com.
- Farge D, Lebbe C, Marjanovic Z. Human herpes virus-8 and other risk factors for Kaposi's sarcoma in kidney transplant recipients. Groupe Cooperatif de Transplantation d'Ile de France (GCIF). *Transplantation* 1999;67:1236–1242.
- Fernández L, Serraino D, Rezza G, Lence J, Ortiz RM, Cruz T, et al. Infection with human herpesvirus 8 and human T-cell leukaemia virus type I among individuals participating in a case-control study in Havana City, Cuba. *Brit J Cancer* 2002;87:1253–1256.
- Flamand L, Zeman RA, Bryant JL. Absence of human herpesvirus 8 DNA sequences in neoplastic Kaposi's sarcoma cell lines. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13:194–197.
- Foreman KE, Friborg JJ, Kong WP. Propagation of a human herpesvirus from AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1997;336:163–171.
- Friedman-Kien AE, Saltzman BR, Cao Y. Kaposi's sarcoma in HIV-negative homosexual men. *Lancet* 1990;335:168–169.
- Fuji T, Taguchi H, Katano H. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1- positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J Med Virol* 1999;57:159–162.
- Gallo RC. The enigmas of Kaposi's sarcoma. *Science* 1998;282:1837–1839.
- Gao S, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians, and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nature Med* 1996a;2:925-8.
- Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spirat TJ, Rinaldo CR, Saah A, et al. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1996b;335:233–241.
- Gao SJ, Zhang YJ, Deng JH. Molecular polymorphism of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human herpesvirus 8) latent nuclear antigen: Evidence for a large repertoire of viral genotypes and dual infection with different viral genotypes. *J Infect Dis* 1999;180:1466–1476.
- Geddes M, Franceschi S, Barchielli A. Kaposi's sarcoma in Italy before and after the AIDS epidemic. *Br J Cancer* 1994;69:333–336.
- Gessain A, Mauclore P, van Beveren M, Plancoulaine S, Ayouba A, Essame-Oyono JL, et al. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int J Cancer* 1999;81:189–192.
- Gessain A, Sudaka A, Briere J, Fouchard N, Nicola MA, Rio B, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castleman's disease: is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patient? *Blood* 1996, 87:414-416.

- Giraldo G, Beth E, Coeur P. Kaposi's sarcoma: A new model in the search for viruses associated with human malignancies. *J Natl Cancer Inst* 1972;49:1495–1507.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386–401.
- Glenn M, Rainbow L, Aurad F. Identification of a spliced gene from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoding a protein with similarities to latent membrane proteins 1 and 2A of Epstein-Barr virus. *J Virol* 1999;73:6953–6963.
- Goedert JJ, Kedes DH, Ganem D. Antibodies to human herpesvirus 8 in women and infants born in Haiti and the USA. *Lancet* 1997;349:1368.
- Goudsmit J, Renwick N, Dukers N, Coutinho R, Heisterkamp S, Bakker M, et al. Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam Cohort Studies (1984–1997): analysis of seroconversions to ORF65 and ORF73. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:4838–43.
- Gruffat H, Portes-Sentis S, Sergeant A, Manet E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) encodes a homologue of the Epstein-Barr virus bZip protein EB1. *J Gen Virol* 1999;80:557–561.
- Grulich AE, Beral V, Sverdlow AJ. Kaposi's sarcoma in England and Wales before the AIDS epidemic. *Br J Cancer* 1992;66:1135–1137.
- Grulich AE, Olsen SJ, Luo K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: A sexually transmissible infection? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:387–393.
- Guancho, J. Componentes étnicos de la nación cubana. Fundación Fernando Ortiz / Fondo de Cultura, La Habana, 1996.
- Guerra, R. Manual de historia de Cuba. Editorial de Ciencias Sociales, La Habana, 1971.
- Hall PA, Donaghy M, Cotter FE. An immunohistological and genotypic study of the plasma cell form of Castleman's disease. *Histopathology* 1989;14:333–346.
- Hanson CA, Grizzera G, Patton DF. Clonal rearrangement for immunoglobulin and T-cell receptor genes in systemic Castleman's disease. Association with Epstein-Barr virus. *Am J Pathol* 1988;131:84–91.
- Harwood AR, Osoba SD, Hofstadler SL. Kaposi's Sarcoma in recipients of renal transplants. *Am J Med* 1979;67:759.
- Hayward GS. KSHV strains: The origins and global spread of the virus. *Semin Cancer Biol* 1999;9:187–199.
- Hengge UR, Ruzicka T, Tying SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2. Pathogenesis, Castleman's disease and pleural effusion lymphoma. *Lancet* 2002, 2:344–352.
- Hengge UR, Tossing G, Kourí V, Fruehauff S. Graduated Systemic Treatment of AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. In the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Am J Cancer* 2004;3:133–149.
- Hjalgrim H, Melbye M, Pukkala E. Epidemiology of Kaposi's sarcoma in the Nordic countries before the AIDS epidemic. *Br J Cancer* 1996;74:1499–1502.
- Hofman FM, Wright AD, Dohadwala MM. Exogenous tat protein activates human endothelial cells. *Blood* 1993;82:2774–2780.

- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7276–7280.
- Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, et al. Classic Kaposi sarcoma: Epidemiology and risk factors. *Cancer* 2000;88:500–517.
- Iscovich J, Boffetta P, Winkelmann R. Classic Kaposi's sarcoma in Jews living in Israel, 1961–1989: A population-based incidence study. *AIDS* 1998;12:2067–2072.
- Jaffe HW, Choi K, Thomas PA. National case-control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men. Epidemiologic results. *Ann Intern Med* 1983;99:145–151.
- Jenner RG, Alba MM, Boshoff C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 2001;75:891–902.
- Judde JG, Lacoste V, Briere J. Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:729–736.
- Jung JU, Choi JK, Ensser A, Biesinger B. Herpesvirus saimiri as a model for gammaherpesvirus oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:231–239.
- Kadyrova E, Lacoste V, Duprez R, Pozharissky K, Molochkov V, Huerre M, et al. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant, and AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 2003, 71:548-556.
- Kakoola DN, Sheldon J, Byabazaire N, Bowden RJ, Katongole-Mbidde E, Schulz TF, et al. Recombination in human herpesvirus-8 strains from Uganda and evolution of the K15 gene. *J Gen Virol* 2001; 82:2393-2404.
- Kaposi M. Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. *Arch Dermatol Syphil* 1872;4:265–273.
- Kasolo FC, Mpabalwani E, Gompels UA. Infection with AIDS-related herpesviruses in human immunodeficiency virus-negative infants and endemic childhood Kaposi's sarcoma in Africa. *J Gen Virol* 1997;78:847–856.
- Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, et al. Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol* 2000;74: 3478-85.
- Kedes D, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med.* 1996;2:918-24.
- Kedes DH, Ganem D, Ameli N, Bacchetti P, Greenblatt R, et al. The prevalence of serum antibody to human herpesvirus 8 (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus) among HIV-seropositive and high-risk HIV-seronegative women. *JAMA* 1997;277:478–481.
- Keller R, Zago A, Viana MC, Bourboullia D, Desgranges C, Casseb J, et al. HHV-8 infection in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:879-86.

- Koelle DM, Huang ML, Chandran B. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: Clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis* 1997;176:94–102.
- Komanduri KV, Luce JA, McGrath MS. The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions. *J Acquir Immune Def Syndr Hum Retrovirol* 1996;13:215–226.
- Lacoste J, Brière V, Kassa-Kelembho J, Clyti E, Couppié E, Buchrieser P, et al. Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Nat Cancer Inst* 2000b;92:729-736.
- Lacoste V, Judde JG, Briere J, Tulliez M, Garin B, Kassa-Kelembho E, et al. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 loci, are frequent and widespread. *Virology* 2000c; 278:60-74.
- Lacoste V, Kadyrova E, Chistiakova I, Gurtsevitch V, Judde JG, Gessain A. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia. *J Gen Virol* 2000d;81:1217-1222.
- Lacoste V, Mauclere P, Dubreuil G. KSHV-like herpesviruses in chimps and gorillas. *Nature* 2000a;407:151–152.
- Lallemand F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas JC, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:1404-1408.
- Lee BS, Alvarez X, Ishido S, Lackner AA, Jung JU. Inhibition of intracellular transport of B cell antigen receptor complexes by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1. *J Exp Med* 2000;192:11–21.
- Lee BS, Connole M, Tang Z, Harris NL, Jung J. Structural analysis of the Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus K1 protein. *J Virol* 2003;77:8072-8076.
- Lee BS, Paulose-Murphy M, Chung Y-H, Connole M, Zeichner S, Jung JU. Suppression of tetradecanoyl phorbol acetate-induced lytic reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by K1 signal transduction. *J Virol* 2002;76:12185–12199.
- Lee H, Guo J, Li M, Choi J, DeMaria M, Rosenzweig M, Jung J. Identification of an Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif of K1 Transforming Protein of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Mol and Cell Biol* 1998;18:5219-5228.
- Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 1996;348:858–861.
- Lever W and Schaumburg G. Tumors of vascular origin. In: Walter F lever and Gundula Schaumburg-Lever. Histopathology of the skin. 6ta Ed USA: LIPPINCOTT company; 1983 p:623-651
- Lin JC, Lin SC, Mar EC. Is Kaposi's Sarcoma associated Herpesvirus detectable in semen of HIV-infected homosexual men?. *Lancet* 1995; 346:1601-1602.
- Lin SF, Sun R, Heston L. Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small viral capsid antigen. *J Virol* 1997;71:3069–3076.
- Little RF, Merced-Galindez F, Staskus K. A pilot study of cidofovir in patients with Kaposi's Sarcoma. *J Inf Dis* 1998;187:149-153.

- Lukac DM, Renne R, Kirshner JR, Ganem D. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology* 1998;252:304–312.
- Luppi M, Barozzi P, Schulz TF. Bone marrow failure associated with human herpesvirus 8 infection after transplantation. *N Engl J Med* 2000;343:1378–1385.
- Lyall EG, Patton GS, Sheldon J. Evidence for horizontal and not vertical transmission of human herpesvirus 8 in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:795–799.
- Mann DL, Murray C, O'Donnell M. HLA antigen frequencies in HIV-1-related Kaposi's sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1990;3:S51–S55.
- Manns A, Strickler H, Hanchard B, Manassaram D, Waters D, Ablashi D. Age- and sex-specific seroprevalence of human herpesvirus 8 in Jamaica. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1102-4.
- Martin J, Ganem D, Osmond D, Page-Shafer K, Macrae D, Kedes D. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl J Med*. 1998;338:948-54.
- Masumi A, Wang IM, Lefebvre B. The histone acetylase PCAF is a phorbol-ester-inducible coactivator of the IRF family that confers enhanced interferon responsiveness. *Mol Cell Biol* 1999;19:1810–1820.
- Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer* 1998;77:817–820.
- McAdam A. Discrepant Analysis: How can we test a test?. *J Clin Microb* 2000;38:2027-2029.
- McGeoch DJ, Davison AJ. The descent of human herpesvirus 8. *Semin Cancer Biol* 1999;9:201–209.
- Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar R. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981–1996. *Int J Cancer* 1998;77:543-548.
- Meng YX, Sata T, Stamey FR, Voevodin A, Katano H, Koizumi H, et al. Molecular characterization of strains of Human herpesvirus 8 from Japan, Argentina and Kuwait. *J Gen Virol* 2001;82:499-506.
- Meng YX, Spira TJ, Bhat GJ, Birch CJ, Druce JD, Edlin BR, et al. Individuals from North America, Australasia and Africa are infected with four different genotypes of human herpesvirus 8. *Virology* 1999;15:106-119.
- Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L. Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med* 1996;183:2385-2390.
- Miller G, Heston L, Grogan E. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J Virol* 1997;71:314-324.
- Miller G, Rigsby MO, Heston L, Grogan E, Googan E, Sun R, et al. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1996;334:1292-1297.

- Monini P, Colombini S, Sturzl M. Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood* 1999;93:4044-4058.
- Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles D, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 1996b;70:549-558.
- Moore PS and Chang Y. Kaposi's Sarcoma–Associated Herpesvirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. eds. *Fields Virology*, 4ta. Ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2001. p2803-2833.
- Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, Chang Y. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 1996a;274:1739-1744.
- Moore PS, Chang Y. Antiviral activity of tumor-suppressor pathways: Clues from molecular piracy by KSHV. *Trends Genet* 1998;14:144-150.
- Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma lesions from persons with and without HIV infection. *N Engl J Med* 1995;332:1181-1185.
- Moore PS, Kingsley LA, Holmberg SD, Spirat T, Gupta P, Hoover DR, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1996c;10:175-180.
- Moses AV, Fish KN, Ruhl R. Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. *J Virol* 1999;73:6892-6902.
- Murphy M, Armstrong D, Sepkowitz KA. Regression of AIDS-related Kaposi's Sarcoma following treatment with an HIV-1 protease inhibitor. *AIDS* 1997;11:261-262.
- Nador RG, Cesarman E, Chadburn A. Primary effusion lymphoma: A distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood* 1996;88:645-656.
- Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: Determinants of its pathogenicity? *J Virol* 1997;71:4187-4192.
- Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. Human herpesvirus 8: The first human rhadinovirus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998; 8:73-77.
- Nicholas J, Zong JC, Alcendor DJ. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998;23:79-88.
- O'Brien TR, Kedes D, Ganem D. Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: Rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 1999;180:1010-1017.
- Oksenhendler E, Cazals-Hatem D, Schulz TF. Transient angiolymphoid hyperplasia and Kaposi's sarcoma after primary infection with human herpesvirus 8 in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998;338:1585-1590.
- Olsen SJ, Chang Y, Moore PS. Increasing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus seroprevalence with age in a highly Kaposi's sarcoma endemic region, Zambia in 1985. *AIDS* 1998;12:1921-1925.
- Orenstein JM, Alkan S, Blauvelt A. Visualization of human herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma by light and transmission electron microscopy. *AIDS* 1997;11:F35-F45.

- Osman M, Kubo T, Gill J. Identification of human herpesvirus 8-specific cytotoxic T-cell responses. *J Virol* 1999;73:6136-6140.
- Osoba D, Northfelt DW, Budd DW. Effect of treatment on health-related quality of life in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): related Kaposi's sarcoma: a randomized trial of pegylated liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine. *Cancer Invest* 2001;19:573-580.
- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. *J Biomolecular Tech* 2001;14:33-43.
- Parravicini C, Chandran B, Corbellino M. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemann's disease. *Am J Pathol* 2000;156:743-749.
- Parravicini C, Corbellino M, Paulli M, Chandran B. Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castlemann's disease. *Am J Pathol* 1997a;151:1517-1522.
- Parravicini C, Olsen SJ, Capra M. Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood* 1997b;90:2826-2829.
- Pauk J, Huang ML, Brodie SJ. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* 2000;343:1369-1377.
- Penn I. Kaposi's sarcoma in organ transplant recipients: Report of 20 cases. *Transplantation* 1979;27:8-11.
- Penn I. Secondary neoplasms as a consequence of transplantation and cancer therapy. *Cancer Detect Prev* 1988;12:39-57.
- Pérez J, Torres R, Terry H. HIV infection in Cuba. *AIDS und HIV infektionen* 1993;8:1-9.
- Perna AM, Bonura F, Vitale F, Viviano E, Di Benedetto MA, Ajello F, et al. Antibodies to human herpes virus type 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. *Int J Epidemiol*. 2000;29:175-179.
- Pertel PE, Spear PG, Longnecker R. Human herpesvirus-8 glycoprotein B interacts with Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein 110 but fails to complement the infectivity of EBV mutants. *Virology* 1998;251:402-413.
- Peterson BA, Frizzera G. Multicentric Castlemann's disease. *Semin Oncol* 1993;20:636-647.
- Picchio GR, Sabbe RE, Gulizia RJ. The KSHV/HHV8-infected BCBL-1 lymphoma cell line causes tumors in SCID mice but fails to transmit virus to a human peripheral blood mononuclear cell graft. *Virology* 1997;238:22-29.
- Pierrotti LC, Etzel A, Sumita LM, Braga PE, Eluf-Neto J, de Souza VA, Segurado AA. Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in HIV/AIDS patients from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. *Sex Transm Dis*. 2005;32:57-63.
- Plancoulaine S, Abel L, Tregouet D, Duprez R, van Beveren M, Tortevoeye P, Froment A, Gessain A. Respective roles of serological status and blood specific antihuman herpesvirus 8 antibody levels in human herpesvirus 8 intrafamilial transmission in a highly endemic area. *Cancer Res*. 2004;64:8782-8787.

- Polstra A, van den Burg R, Goudsmit J, Cornelissen M. Human Herpesvirus 8 Load in Matched Serum and Plasma Samples of Patients with AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *J Clin Microb* 2003;41:5488
- Poole LJ, Zong JC, Ciufo DM, Alcendor DJ, Cannon JS, Armbinder R, et al. Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K 15 alleles at the right-hand end. *J Virol* 1999;73: 6646-6660.
- Pozo F, Tenorio A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1999;79:9-19.
- Purvis SF, Katongole-Mbidde, Johnson, JL. High incidence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Epstein-Barr virus in tumour lesions and peripheral blood mononuclear cells from patients with Kaposi's sarcoma in Uganda. *J Infect Dis* 1997;175, 947-950.
- Qunibi W, Akhtar M, Sheth K. Kaposi's sarcoma: The most common tumor after renal transplantation in Saudi Arabia. *Am J Med* 1988;84:225-232.
- Qunibi W, Al FO, Almeshari K, Lin SF, Sun R, Heston L, et al. Serologic association of human herpesvirus eight with posttransplant Kaposi's sarcoma in Saudi Arabia. *Transplantation* 1998;65:583-585.
- Rabkin CS, Bedi G, Musaba E. AIDS-related Kaposi's sarcoma is a clonal neoplasm. *Clin Cancer Res* 1995;1:257-260.
- Rabkin CS, Janz S, Lash A, Coleman AE, Musuba E, Liotta L, et al. Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. *N Engl J Med* 1997;336:988-993.
- Regamey N, Tamm M, Wernli M. Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med* 1998;339:1358-1363.
- Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999;284:1308-1310.
- Renne R, Blackbourn D, Whitby D. Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* 1998;72:5182-5188.
- Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, Ganem D. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med*. 1996;2:342-346
- Renwick N, Halaby T, Weverling GJ. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1998;12:2481-2488.
- Rezza G, Lennette ET, Giuliani M. Prevalence and determinants of anti-lytic and anti-latent antibodies to human herpesvirus-8 among Italian individuals at risk of sexually and parenterally transmitted infections. *Int J Cancer* 1998;77:361-365.
- Rickinson A. Concluding overview: looking back, looking forward. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 2001;356:595-604.
- Robles R, Lugo D, Gee L. Effect of antiviral drugs used to treat cytomegalovirus end-organ disease on subsequent course of previously diagnosed Kaposi's Sarcoma in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:34-38.

- Roizman B and Pellet Ph. The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. et al. eds. *Fields Virology*, 4ta. Ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2001. p 2381-2397.
- Rose TM, Strand KB, Schultz ER. Identification of two homologs of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species. *J Virol* 1997;71:4138-4144.
- Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, et al. Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14862-14867.
- Sarid R, Flore O, Bohenzky RA. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J Virol* 1998;72:1005-1012.
- Sarid R, Olsen SJ, Moore P. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. *Adv Virus Res.* 1999;52:139-232.
- Schulz TF, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: A new human tumor virus, but how? *Trends Microbiol* 1999;7:196-200.
- Schulz TF, Sheldon J, Greensill J. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) or human herpesvirus 8 (HHV8). *Virus Res* 2002; 82:115-126.
- Schulz TF. Kaposi's sarcoma- associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J Antimic Chem* 2000;45:15-27.
- Schulz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8). *J Gen Virol* 1998;79:1573-1591.
- Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: an update. *J Surg Oncol.* 2004;87:146-151.
- Schwarze MM, Hawley RG. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res* 1995;55:2262-2265.
- Simpson G, Schulz T, Whitby D, Cook P, Boshoff C, Rainbow L, et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 1996;348:1133-1138.
- Sitas F, Carrara H, Beral V, Newton R, Reeves G, Bull D, et al. Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with cancer. *N Engl J Med* 1999a;340:1863-1871.
- Sitas F, Newton R, Boshoff C. Increasing probability of mother-to-child transmission of HHV-8 with increasing maternal antibody titer for HHV-8. *N Engl J Med* 1999b;340:1923.
- Smacchia C, Parolin A, Piselli P, Scuderi M, Serraino D, Rezza G, et al. Infection with human herpesvirus type-8 among foreign female sex workers in Italy. *Infection.* 2004;32:303-305.
- Smith N, Sabin C, Gopal R, Bourboullia D, Labbet W, Boshoff C, et al. Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. *J Infect Dis.* 1999;180:600-606.

- Soulier J, Grollet L, Oskenhendler E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 1995;86:1276–1280.
- Staskus KA, Zhong W, Gebhard K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol* 1997;71:715–719.
- Stein L, Carrara H, Norman R, Alagiozoglou L, Morris L, Sitas F. Antibodies against human herpesvirus 8 in South African renal transplant recipients and blood donors. *Transpl Infect Dis*. 2004;6:69-73.
- Sternlicht MD and Bergers G. Matrix metalloproteinases are emerging targets in anticancer therapy; status and prospects. *Emerging Ther Targets* 2000;4:609-633.
- Stine JT, Wood C, Hill M. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts Th2 cells. *Blood* 2000;95:1151-1157.
- Sturzl M, Wunderlich A, Ascherl G. Human herpesvirus-8 (HHV-8) gene expression in Kaposi's sarcoma (KS) primary lesions: An in situ hybridization study. *Leukemia* 1999;13[Suppl 1]:S110-112.
- Sun R, Lin SF, Gradoville L. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10866-10871.
- Sun R, Lin SF, Staskus K. Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J Virol* 1999;73:2232-2242.
- Talbot S y Whitby D. Kaposi's Sarcoma an Human Herpesvirus 8. In: Angus G. Dalgleish & Robin A Weiss eds. HIV and the New Viruses. London Academic Press; 1999: p360-384.
- Taylor JF, Smith PG, Bull D, Pike MC. Kaposi's sarcoma in Uganda: geographic and ethnic distribution. *Br J Cancer* 1972;26:483-497.
- Taylor MM, Chohan B, Lavreys L, Hassan W, Huang ML, Corey L, et al. Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and -seronegative Kenyan women. *J Infect Dis* 2004;190:484-488.
- Tedeschi CG. Some considerations concerning the nature of the so-called sarcoma of Kaposi. *Arch Pathol* 1958;66:656-684.
- Tedeschi R, Enbom M, Bidoli E, Linde A, De Paoli P & Dillner J. Viral load of human herpesvirus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 2001;39:4269-4273.
- Titus JL, Kim H. Blood vessels and lymphatics. In: Damjanov Ivan and Linder James. Anderson's pathology. 9th ed. Vol. I. St. Louis: C.V. Mosby Company; 1990. Pp. 752-770.
- Tossing G. New developments in interferon therapy. *Eur J Med Res* 2001;6:46-47.
- Treurnicht FK, Engelbrecht S, Taylor MB, Schneider JW, van Rensburg EJ. HHV-8 subtypes in South Africa: identification of a case suggesting a novel B variant. *J Med Virol* 2002;66:235-240.
- Trus BL, Heymann JB, Nealon K. Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes

simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *J Virol* 2001;75:2879-2890.

- Vaneechoutte M, and Van Eldere J. The possibilities and limitations of nuclei acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J. Med Microbiol.* 1997;46:188-194.
- Volkenandt M, Dicker A, Fanin R, Banerjee D, Albino and Bertino JR. Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Paraffin-Embedded Tissue In: *Methods in Molecular Biology. PCR protocols: Current Methods and Applications.* Totowa, NJ: Humana Press Inc. 1993.p:81-87.
- Walter PR, Philippe E, Nguemby-Mbina C, Chamlian A. Kaposi's sarcoma: Presence of herpes-type particles in a tumor specimen. *Hum Pathol* 1984;15:1145-1146.
- Wang YC, Zhang Q, Montalvo EA. Purification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) and analyses of the structural proteins. *J Virol Methods* 1998;73:219-228.
- Weber T, Frye S, Bodemer M, Otto M, Luke W. Clinical implications of nuclei acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovir* 1996;2:175-190.
- Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink N, Copas A, Boshoff, et al. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in peripheral blood of HIV-infected individuals predicts progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;364:799-802.
- Whitby D, Luppi M, Barozzi P. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:395-397.
- Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache J, Guzmán JR, et al. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol* 2004;85:155-163.
- Whitby D, Smith N, Matthews S, O'Shea S, Sabin C, Kulasegaram R, et al. Human herpesvirus 8: seroepidemiology among women and detection in the genital tract of seropositive women. *J Infect Dis.* 1999;179:234-236.
- Wilkinson D, Sheldon J, Gilks C, Schulz T. Prevalence of infection with human herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in rural South Africa. *S Afr Med J.* 1999;89:554-557.
- Wineslaus J. Regression of AIDS-related pleural effusion with HAART: Highly active antiretroviral therapy. *Int J STD AIDS* 1998;9:368-370.
- Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3806-3810.
- Yu Y, Black JB, Goldsmith CS. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J Gen Virol* 1999;80:83-90.
- Ziegler J, Newton R, Bourboullia D, Casabonne D, Beral V, Mbidde E, et al. Risk factors for Kaposi's sarcoma: a case-control study of HIV-seronegative people in Uganda. *Int J Cancer.* 2003;103:233-240.
- Ziegler JL, Katongole-Mbidde E. Kaposi's sarcoma in childhood: An analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. *Int J Cancer* 1996;5:200-203.
- Zong J, Ciufo D, Viscidi R, Alagiozoglou L, Tying S, Rady P, et al. Genotypic analysis

at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J Clin Virol* 2002;23:119-148.

- Zong JC, Ciufo DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, et al. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J Virol* 1999;73:4156-4170.