

Virus herpes humano 8: detección en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana con/sin sarcoma de Kaposi

Drs. Dimas E. Hernández*, Jorge Riera*, José Pinto*, María E. Marín**, José L. López***

RESUMEN

El ácido nucleico proveniente del virus herpes humano 8 está presente en las células mononucleares de sangre periférica de un 50 % a 90 % de los pacientes con sarcoma de Kaposi, y 7 % a 10 % de los pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana sin sarcoma de Kaposi. Nosotros estudiamos la prevalencia del virus herpes humano 8 en células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana con/sin sarcoma de Kaposi. Setenta y seis pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana sin sarcoma de Kaposi y 15 pacientes con sarcoma de Kaposi asociado a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana se incluyeron en el estudio. El ácido desoxirribonucleico se extrajo utilizando el método de fenol/cloroformo. El ácido desoxirribonucleico fue amplificado a través de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando las sondas KS1 y KS2 específicas para el ORF 26 del virus herpes humano 8. Las reacciones se consideraron positivas sólo si los productos de la reacción en cadena de la polimerasa hibridizaron en la región esperada de 233 pares de bases. Ninguno de los pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana mostró la presencia del virus herpes humano 8 en las células mononucleares de sangre periférica, y después de un seguimiento de 2 años, ninguno ha desarrollado sarcoma de Kaposi. El virus herpes humano 8 se detectó en las células mononucleares de sangre periférica del 20 % de los pacientes con sarcoma de Kaposi. Todos los pacientes pertenecían al grupo de "alto riesgo", y eran varones homosexuales. Ninguno recibió transfusiones sanguíneas. Estos datos preliminares sugieren que la prevalencia del virus herpes humano 8 en las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana con/sin sarcoma de Kaposi es

probablemente baja en comparación con pacientes provenientes de Estados Unidos y Europa.

Palabras clave: Virus de inmunodeficiencia humana. Sarcoma de Kaposi. Virus herpes humano 8

SUMMARY

The nucleic acid of human herpes virus 8 is present in the peripheral blood mononuclear cells of between 50 % and 90 % of Kaposi sarcoma patients, 7 % and 10 % of human immunodeficiency virus infected patients without Kaposi sarcoma. We studied the prevalence of human herpes virus 8 in peripheral blood mononuclear cells from patients with human immunodeficiency virus infection with/without Kaposi sarcoma. Seventy-six patients with human immunodeficiency virus infection without Kaposi sarcoma and 15 patients with Kaposi sarcoma associated with human immunodeficiency virus infection were included. Desoxirribonucleic acid was extracted from the samples by a standard phenol/chloroform extraction procedure. Desoxirribonucleic acid was polymerase chain reaction amplified using Kaposi sarcoma 1 and Kaposi sarcoma 2 primers specific for the human herpes virus 8 ORF26. Polymerase chain reaction reactions were considered positive only if the polymerase chain reaction products hybridized in the expected 233 bp region. None of human immunodeficiency virus infected patients showed the presence of human herpes virus 8 in the peripheral blood mononuclear cells, and after a follow-up of 2 years, none has developed Kaposi sarcoma. Human herpes virus 8 was detected in the peripheral blood mononuclear cells from 20 % of patients with Kaposi sarcoma. All patients belonged to a "high risk group", were male and homosexuals. None received blood transfusion. These preliminary data suggest that the prevalence of human herpes virus 8 in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus infected patients with/without Kaposi sarcoma is probably low in comparison with patients from EE.UU and Europe.

*Escuela de Medicina José María Vargas, Departamento Médico, Hospital Vargas, Universidad Central de Venezuela; ** Servicio de Infectología, Hospital Vargas; ***Laboratorio de Biología Molecular, Banco Municipal de Sangre, Distrito Metropolitano

Key words: Human immunodeficiency virus. Kaposi sarcoma. Human herpes virus 8.

INTRODUCCIÓN

El sarcoma de Kaposi (SK) ha sido clasificado en varios tipos clínico-epidemiológicos (1). El SK clásico es un cáncer poco frecuente, afecta fundamentalmente a personas de edad avanzada, sobre todo del área del mediterráneo y Europa Oriental; generalmente es de evolución lenta y las lesiones se ubican predominantemente en miembros inferiores. El SK en el África, es endémico, mucho más agresivo y se distribuye fundamentalmente en el África sub-sahariana. El SK iatrogénico se observa en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, sobre todo en aquellos sometidos a trasplantes. El SK epidémico se observa en los pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), principalmente en el grupo homosexual. Todas estas formas epidemiológicas tienen histopatología similar, sugiriendo un origen común. Varios trabajos han sugerido que el agente etiológico se transmite predominantemente por contacto sexual (1). Chang y col. (2) identificaron, a través de un análisis de representación diferencial, secuencias de ADN de un nuevo herpes virus homólogo al virus de Epstein-Barr (EBV) y al herpes virus Saimiri, llamado virus del SK o virus herpes humano 8 (VHH8) en lesiones de SK. Desde entonces, secuencias del ADN del VHH8 se han identificado en todas las variantes epidemiológicas de SK, en pacientes provenientes de EE.UU (3), Europa (4) y Suramérica, incluyendo a Venezuela (5,6). Secuencias del virus también han sido detectadas, en porcentajes variables, en las células mononucleares de sangre periférica (CMP) de pacientes con SK asociado a la infección por el VIH (7). La presencia del VHH8 en sangre periférica de pacientes con la infección por el VIH, indica una alta probabilidad del desarrollo del SK (8). En el presente trabajo nosotros reportamos la prevalencia de VHH8 en CMP provenientes de un grupo de pacientes con la infección por el VIH con/sin SK asociado.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes: El presente estudio fue previamente aprobado por la Comisión de Ética del Hospital Vargas de Caracas y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio. Se incluyeron 76 pacientes VIH positivos

sin SK y 15 pacientes con SK asociado a la infección por el VIH provenientes del Servicio de Infectología del Hospital Vargas entre el lapso comprendido entre enero y octubre de 2004, todos ellos fueron seguidos hasta octubre de 2006. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a la definición de caso-SIDA del *Centres for Disease Control and Prevention* (CDC) (Atlanta, EE.UU) de 1992 (9) y aquellos con SK fueron clasificados de acuerdo al ACTG (*AIDS Clinical Trial Group*) (10) en pacientes de “bajo riesgo” y “alto riesgo”. Se calculó el tamaño de la muestra para un valor de α : 95 % con base a la prevalencia del VHH8 en algunas series internacionales publicadas provenientes de Europa, EE.UU, América del Sur y África. Número mínimo de pacientes VIH positivos sin SK: 60 y con SK: 15.

Detección del ADN de VHH8 en células mononucleares de sangre periférica (CMP) con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Separación de los CMP: las CMP se obtuvieron a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque, lavados con PBS, y preservados a -70°C hasta el momento de usarlos para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN fue extraído de las CMP utilizando el método estándar de fenol/cloroformo (11).

Amplificación del ADN: todas las muestras del ADN fueron susceptibles para ser amplificadas de acuerdo a sondas específicas ya que conservaron la región del gen que codifica la β -globina (11,12). Se incluyeron controles positivos (ADN proveniente de biopsias de SK) y controles negativos. El ADN fue amplificado a través de la PCR con condiciones específicas para el fragmento de 233-pares de bases (pb) (KS 330233) que incluye el frente abierto de lectura (ORF) 26, como fue previamente descrito (2). Cada reacción del PCR incluyó 1 μg de ADN genómico, 100 pmol de cada sonda específica (5' - TCCGTGTTGTCTACGTCCAG-3' y 5' - AGCCGA AAGGATTCC-ACCAT- 3'), 2 unidades de “Taq ADN polimerasa” (Boehringer), 100 mM de trifosfato deoxinucleótido, MgCl 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris HCl (pH: 9,0) 10 mM y Tritón X-100 al 0,1 % en un volumen final de 50 mL. La amplificación se llevó a cabo a 94°C por 2 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto (35 ciclos) y 72°C por 5 minutos (1 ciclo), en un termociclador “Perkin-Elmer 480”. Para evitar la contaminación durante la PCR, se utilizaron cuartos separados para los diferentes pasos del procedimiento, así como filtros para las puntas de las pipetas. Los productos de amplificación se

visualizaron en geles de agarosa al 1 % y bromuro de etidio y se detectó la presencia o ausencia del fragmento 233-pb. Posteriormente los productos de amplificación se transfirieron a una membrana (Hybond N, Amersham) y fueron sometidos a hibridización a través del procedimiento de "Southern blot", a 52° C con una sonda específica de 25-pb (5'- TGCAGCAGCTGTTGGTGTA-CACAT-3'), marcando el segmento terminal 3' con digoxigenina (*DIG oligonucleotide mailing kit*, Boehringer Mannheim). El siguiente paso se llevó a cabo con el kit para detección de luminiscencia proveniente de ácidos nucleicos (Boehringer Mannheim), y la hibridización se visualizó después de exponer la membrana a un film de rayos-X (Kodak X-omat, Sigma). La reacción de la PCR se consideró positiva solo si el producto amplificado por la PCR hibridizó en la región del segmento de 233-pb.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran las principales características de los grupos de estudio. La edad fue bastante similar en ambos grupos, y hubo menor número de pacientes femeninas en el grupo VIH positivo con SK. Con referencia a la conducta sexual, el grupo heterosexual predominó en los pacientes VIH positivo sin SK; en cambio, la conducta homosexual fue predominante en el grupo VIH positivo con SK. El promedio de células T-CD4 positivas fue mayor en el grupo de pacientes VIH positivos sin SK. Con referencia a los pacientes con SK asociado a la infección por el VIH, 14 (93 %) pertenecían al grupo de "alto riesgo" y 1 (7 %) al "bajo riesgo". En ninguno de los pacientes VIH positivo sin SK se detectó el VHH8 en los CMP, este grupo ha sido evaluado en la consulta de infectología del Hospital Vargas durante 2 años, sin aparición de SK. Solamente se detectó el VHH8 en los CMP de 3 (20 %) pacientes masculinos con SK de "alto riesgo" (Cuadro 2). Estos pacientes se encuentran bajo tratamiento con terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE), en 2 de ellos el SK ha tenido una respuesta parcial sin requerir quimioterapia adicional. Un paciente progresó a pesar de la TAAE, y obtuvo una respuesta parcial al tratamiento con doxorubicina liposomal y paclitaxel.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio el grupo VIH positivo sin SK no mostró la presencia del VHH8 en los CMP a pesar de un diagnóstico no reciente de la infección por el VIH; otras series reportan entre un 7 % a 10 % la

Cuadro 1

Características socio epidemiológicas y niveles de células T-CD4 en pacientes positivos al virus de inmunodeficiencia humana con/sin sarcoma de Kaposi (SK)

Parámetros	Pacientes sin SK (n = 76)	Pacientes con SK (n = 15)
Edad(años)		
Promedio	35,9	38,6
Rango	19 - 69	20 - 69
Sexo (n)		
Masculino	60	14
Femenino	161	
Conducta sexual (n)		
Heterosexual	7	12
Homosexual	5	13
Tiempo de diagnóstico (años)		
Promedio	4,9	3,0
Desviación estándar	3,8	2,5
Drogas antiherpéticas (n)	7	1
Terapia antirretroviral (n)	56	12
Contaje de linfocitos T-CD4(mm ³)		
Promedio	362,0	85,6
Desviación estándar	210,3	96,4

Cuadro 2

Características socio epidemiológicas de pacientes con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana y sarcoma de Kaposi con el virus herpes humano 8 positivo en las células mononucleares de sangre periférica

Parámetros	Pacientes (n = 3)
Edad (años)	
Promedio	52,6
Rango	44-69
Sexo (n)	
Masculino	3
Conducta sexual (n)	
Homosexual	3
Transfusiones (n)	0
Tiempo de diagnóstico (años)	
Promedio	2
Rango	1- 4

presencia del VHH8 en los CMP (13). No tenemos una explicación clara de la negatividad del VHH8 en los CMP, sin embargo, una posibilidad es el uso de la TAAE y el aciclovir en un grupo de estos pacientes

(11); además, debemos señalar que el promedio de células T-CD4 positivas era relativamente alto (362 cel/mm³) lo cual le confiere una mayor protección a estos enfermos en contra de la infección viral (14). Una tercera posibilidad es el hecho de que en este grupo predominó la transmisión heterosexual (93 %), y ha sido reportado una mejor transmisión del VHH8 si el contacto es homosexual (15). Otro hallazgo relevante es la no aparición de SK durante un seguimiento de 2 años. Esto refuerza el hecho de la real negatividad del VHH8 y el papel de este virus en la patogenicidad del SK. Con referencia al grupo de pacientes con SK, observamos que el VHH8 se detectó en el 20 % de los pacientes, todos con SK de "alto riesgo", porcentaje inferior a otras series reportadas (50 % a 90 %) (11). Este hallazgo podría explicarse por el uso de TAAE en la mayoría de los pacientes (80 %) pues los otros factores favorecen la transmisión: un promedio de células T-CD4 positivas bajo (85,6 cel/mm³) y un predominio de contactos homosexuales (87 %). Además debemos resaltar, que la negatividad del VHH8 en las CMP no descarta la infección en otros órganos linfoides del paciente (16).

Finalmente, aunque se trata de un estudio preliminar, por primera vez se detecta en pacientes venezolanos la presencia del VHH8 en las CMP. Consideramos que el grupo de estudio es una muestra representativa proveniente de un centro nacional de referencia de pacientes con la infección por el VIH del Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS), y nos señala que probablemente la prevalencia del VHH8 en las CMP de nuestra población VIH positiva con/sin SK es baja.

REFERENCIAS

1. Fouchard N, Lacoste V, Couppie P, Develoux M, Mauciere P, Michel P, et al. Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America. *Int J Cancer*. 2000;85:166-170.
2. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;266:1865-1869.
3. Schulz TF. Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Gen Virol*. 1998;79:1573-1591.
4. Boshoff C, Weiss R. Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *Advanc Cancer Res*. 1998;75:57-86.
5. Hernández DE, Masquelier B, Pérez O, Oliver M, Fleury HJA. Human herpesvirus 8 variants in venezuelan patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Clin Infect Dis*. 2003;36:385-386.
6. Caterino-de-Araujo A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis*. 1998;177:1136-1137.
7. Whithy D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, et al. Detection of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 1995;346:799-802.
8. Ambroziak JA, Blackburn DJ, Herndier BG, Glogar RG, Gullet JH, McDonald AR, et al. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science*. 1995;268:582-583.
9. Centre for Disease Control. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR*. 1992;41:1-19.
10. Krown SE, Testa MA, Huang J. AIDS-related Kaposi's sarcoma: Prospective validation of the AIDS clinical trial group staging classification. *J Clin Oncol*. 1997;15:3085-3092.
11. Dupon M, Masquelier B, Cazorla C, Chêne G, Dumon B, Ragnaud JM, et al. Acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 DNA detection in serial peripheral blood mononuclear cell samples. *Res Virol*. 1997;148:1-9.
12. Di Alberti L, Ngui SL, Porter SR, Speight PM, Scully CM, Zakrewska JM, et al. Presence of human herpes virus 8 variants in the oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons. *JID*. 1997;175:703-707.
13. Campbell TB, Fitzpatrick L, MaWhinney S, Zhang X, Schooley RT. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) infection in men receiving treatment for HIV-1 infection. *JAIDS*. 1999;22:333-340.
14. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpes virus 8 infection. *N Engl J Med*. 1998;338:948-954.
15. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med*. 2000;342:1027-1038.
16. Kedes DH, 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;2:918-924.

AGRADECIMIENTO

Este Proyecto fue financiado por la Sociedad Venezolana de Infectología

Correspondencia: Dr. Dimas E. Hernández, Apartado Postal 75196, El Marqués, Caracas 1070-A, Venezuela; telefax: 212-5629928; e-mail: dimas78@hotmail.com

INFORME: Conferencia Internacional de la Sociedad Americana de enfermedades del tórax.

Fueron presentados y discutidos los más recientes avances relacionados con problemas clínicos, investigación y programas de educación desarrollados en el campo de las enfermedades respiratorias y especialidades relacionadas, con la asistencia de aproximadamente 16 000 personas, colegas procedentes de diferentes partes del mundo.

Se realizaron más de 400 sesiones enfocando aspectos clínicos, diagnósticos y tratamientos, (800 conferencistas) 5 586 trabajos de investigación (escrito y oral) y 26 cursos de posgrado en 6 días de actividades, destacándose la base de los tres pilares en los cuales se apoya la especialidad: estudio de enfermedades pulmonares, cuidados intensivos y problemas del sueño.

Se incluyeron tópicos como los efectos del alcohol en paciente con situaciones críticas, impacto ambiental (polución) sobre el tracto respiratorio superior, enfermedad eosinofílica del pulmón y la adicción nicotínica.

La sociedad hoy día está constituida por 18 000 miembros distribuidos en las diferentes subespecialidades que la integran como son: neumonólogos, intensivistas, cirujanos del tórax, infectólogos y especialistas en medicina del sueño, en problemas de conducta y medicina ocupacional- ambiental, entre otras.

Se hizo mucho hincapié en la necesidad de limpiar el aire para una vida mejor con especial mención sobre programas de cesación tabáquica.

En el programa destacaron temas como:

- * Controversias en medicina pulmonar y cuidados intensivos, enfocando problemas clínicos sobre neurobiología y trastornos del sueño, alergia, inmunología e inflamación, así como aspectos circulatorios y respiratorios en cuidados intensivos.
- * Investigación en asma involucrando procesos alérgicos, inmunológicos e inflamatorios enfocados desde el punto de vista de biología

molecular, estructura y función celular.

- * Adicción nicotínica con énfasis en aclarar el aire.
- * Resultados de la cirugía en enfisema pulmonar extremo utilizando reducción del volumen pulmonar. Se examinaron los resultados obtenidos por tratamiento quirúrgico y fueron comparados con los resultados obtenidos por tratamiento médico siguiendo las normas de selección, la sobrevida, desarrollo de ejercicios y calidad de vida, costo - beneficio a largo tiempo.
- * Como novedad se presentó el ultrasonido transbronquial para diagnóstico de certeza y estadio clínico del cáncer pulmonar.
- * Neumonía intersticial idiopática, aproximaciones diagnósticas según los diferentes abordajes (multidisciplinariedad), llamando la atención perlas radiológicas con presentación de casos.
- * Base molecular de la hipertrofia de ventrículo derecho e insuficiencia de ventrículo derecho en hipertensión pulmonar. Como abordar el problema.
- * Combinación de tomografía por emisión de positrones (PET) más fibrobroncoscopia más ultrasonido transbroncoscópico con aguja fina, para un mejor diagnóstico de la adenopatía mediastinal en el estudio del cáncer pulmonar.
- * Citología broncoscópica de gran interés en la identificación de lesiones malignas incipientes.
- * En derrame pleural maligno preferible usar talco para pleurodesis por medio de videotoracoscopia.

San Francisco, California, EE.UU. Mayo 2007.


Dr. Felipe Martin Piñate
 Invitado de cortesía