

SARCOMA DE KAPOSÍ EPIDÉMICO:

1. POLIMORFISMO GENÉTICO DEL VIRUS HERPES HUMANO 8.
2. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DIFERENCIAL DE LA DOXORUBICINA LIPOSOMAL

DIMAS E. HERNÁNDEZ

SERVICIO DE MEDICINA INTERNA; ESCUELA DE MEDICINA JOSÉ MARÍA VARGAS; UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA; CARACAS; VENEZUELA

MENCIÓN HONORÍFICA PREMIO "BERNARDO GUZMÁN BLANCO". 2004

RESUMEN

OBJETIVOS: Los objetivos del presente trabajo son: 1. Estudiar el polimorfismo genético del virus herpes humano tipo 8 en un grupo de pacientes con sarcoma de Kaposi de "bajo riesgo". 2. Demostrar la actividad farmacológica diferencial de la doxorubicina liposomal en pacientes con sarcoma de Kaposi de "alto riesgo", gastrointestinal y cutáneo. **MÉTODOS:** Nueve pacientes homo o bisexuales masculinos, con sarcoma de Kaposi de "bajo riesgo" se incluyeron en el estudio. El ADN fue extraído de las lesiones cutáneas y amplificados. 2. Quince pacientes homo o bisexuales masculinos con sarcoma de Kaposi de "alto riesgo", gastrointestinal y cutáneo se incluyeron en el estudio. Fueron tratados con 6 ciclos de doxorubicina liposomal. **RESULTADOS:** Se obtuvo el subtipo B en 5 (56 %) pacientes, el subtipo C en 3 (33 %) y el subtipo A en 1 (11 %). Once (73 %) pacientes obtuvieron una respuesta completa de las lesiones gastrointestinales y 4 (27 %) una respuesta parcial; 2 (13 %) pacientes lograron una respuesta completa de las lesiones cutáneas, 6 (40 %) una respuesta parcial y 7 (47 %) estabilizaron la enfermedad ($P < 0,00035$). **CONCLUSIONES:** Existe un polimorfismo genético del virus herpes humano tipo 8 en pacientes venezolanos, parecido a los reportes brasileños y africanos. Los subtipos B y C se relacionaron con una evolución benigna de la enfermedad. La doxorubicina liposomal es muy efectiva en las lesiones gastrointestinales extensas en comparación con las lesiones cutáneas.

PALABRAS CLAVE: Sarcoma de Kaposi, SIDA, polimorfismo genético, doxorubicina liposomal.

SUMMARY

OBJECTIVES: The objectives of the present paper are: 1. The study of the genetic polymorphism of the human herpes virus 8 in a group of patients with "low risk" Kaposi's sarcoma. 2. The study of differential pharmacologic activity of liposomal doxorubicin in patients with "high risk" Kaposi's sarcoma, gastrointestinal and cutaneous. **methods:** Nine homo or bisexual male patients with "low risk" Kaposi's sarcoma were included in the study. The DNA was extracted from cutaneous biopsies and amplified through the PCR using specific primers for the HHV8 ORF26. 2. Fifteen homo or bisexual male patients with "high risk" Kaposi's sarcoma, gastrointestinal and cutaneous were included. They were treated with 6 cycles of doxorubicin liposomal. **RESULTS:** 1. Subtype B was found in 5 (56 %) patients, subtype C in 3 (33 %) and subtype A in 1 (11 %). 2. Eleven (73 %) patients achieved a complete response of the gastrointestinal lesions and 4 (27%) a partial response; 2 (13 %) patients showed a complete response of the cutaneous lesions, 6 (40 %) a partial response and 7 (47 %) stabilized the disease ($P < 0.00035$). **CONCLUSIONS:** There is a genetic polymorphism of the human herpes virus 8 in Venezuelan patients and looks like similar to the Brazilian and African reports. The B and C subtypes are correlated with a benign evolution of the disease. The doxorubicin liposomal is very effective in extensive gastrointestinal Kaposi's sarcoma lesions in comparison with cutaneous ones.

KEY WORDS: Kaposi's sarcoma, AIDS, genetic polymorphism, liposomal doxorubicin.

Recibido: 12/07/2004 Revisado: 15/08/2004
Aceptado para Publicación: 10/10/2004

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

INTRODUCCIÓN

E

l sarcoma de Kaposi (SK) fue descrito inicialmente en 1872 como “lesiones múltiples, idiopáticas en la piel”, por Moritz Kaposi. La forma diseminada se describió en 1887 y en 1882 el primer caso reportado en niños.

Es un tumor raro excepto en ciertas regiones de África. La experiencia en la Clínica Mayo (EE.UU) durante 38 años arrojó una frecuencia de 0,067 %, contrariamente a lo observado en Uganda y Zaire donde el SK representó el 9 % de todas las neoplasias. El SK clásico se había descrito afectando a individuos mayores de 60 años, quienes tenían en su ascendencia personas provenientes de Europa Oriental, Italia o Israel. Las lesiones se ubicaban en las piernas y, rara vez comprometían la vida de los enfermos. Además, se había descrito una forma más agresiva en África, la cual, atacaba a personas más jóvenes y podía poner en peligro su vida. En 1981 se comienzan a observar casos en homosexuales jóvenes con gran depresión de la inmunidad celular y se identifica esta forma como sarcoma de Kaposi epidémico (SKE) ⁽¹⁾. El SKE es la neoplasia más común en los pacientes con SIDA ⁽²⁾ y, hasta 1994, en algunas cohortes de homosexuales el riesgo de adquirir el SK durante la vida de estos individuos se acercó al 50 % ⁽³⁾. Con la introducción de la terapia antirretroviral altamente efectiva (HAART) a partir de 1996, se ha observado una disminución de los casos de SK ⁽⁴⁾; sin embargo, en los países del tercer mundo donde no se ha incorporado de una manera extensiva el uso del HAART, el SK continúa siendo frecuente en los pacientes con SIDA, sobre todo las formas viscerales ⁽⁵⁾, las cuales, pueden comprometer la vida de estos enfermos.

El SK se origina principalmente en la piel y mucosas con invasión posterior a los ganglios linfáticos y vísceras. Las lesiones van desde

aquellas que se asemejan a un tejido de granulación (lesiones tempranas), a aquellas que se asemejan a angiosarcomas (lesiones tardías). La célula que prolifera es de origen endotelial, sin embargo, hay otras evidencias que sugieren su origen a partir de células musculares lisas vasculares ⁽⁶⁾. Histológicamente la célula es fusiforme con espacios pequeños entre ellas que contienen glóbulos rojos extravasados; además, se pueden observar fibroblastos, células inflamatorias, y evidencia de neoangiogénesis ⁽⁷⁾. En 1994 Chang y col. ⁽⁸⁾, identificaron fragmentos de ADN de un herpesvirus no reconocido previamente, en una lesión cutánea de SK proveniente de un paciente con SIDA; este virus se llamó virus herpes humano tipo 8 (VHH8). Actualmente ha sido demostrado que el 95 % de las lesiones de SK, independiente de su procedencia o subtipo clínico, se encuentran infectadas por el VHH8. Aunque se han publicado estudios que demuestran la contribución de citoquinas y la proteína tat del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en el desarrollo de las lesiones de SK, la presencia del VHH8 es el factor etiológico principal de esta neoplasia ⁽¹⁰⁾. Además, existen evidencias de la participación de la inmunosupresión del huésped en la expresión clínica del tumor ⁽⁹⁾.

El VHH8 es el octavo virus herpes que se ha identificado. La mayoría de los virus herpes están asociados con enfermedades en el paciente inmunocomprometido, como resultado de la reactivación de un virus latente o la proliferación de células transformadas ⁽¹⁰⁾. El VHH8 y el virus de Epstein-Barr son miembros de la familia gammaherpesvirus ⁽¹¹⁾. Los gammaherpesvirus son conocidos como causantes de trastornos linfoproliferativos en humanos y animales. Los estudios epidemiológicos moleculares sugieren que el VHH8 ha sido patógeno al ser humano desde hace muchos años y se ha diseminado muy lentamente en la población ⁽¹²⁾. Otra alternativa que se ha

planteado, es que el virus se ha convertido en patógeno para el ser humano recientemente, proveniente de un primate africano, y se diseminó lentamente en la población mediterránea ⁽¹⁰⁾.

El genoma del VHH8 se encontró que medía 165-kb, y se terminó de conocer toda su secuencia 2 años después de su descubrimiento ⁽¹³⁾. El VHH8 incorporó en su genoma varios genes de la célula huésped durante su evolución. Por ejemplo, el VHH8 es capaz de codificar varias oncoproteínas similares a oncoproteínas humanas; entre ellas, tenemos una ciclina que inhibe la proteína del retinoblastoma, la cual, controla el paso de las células de la fase G1 a la S ⁽¹⁴⁾, y la proteína similar a Bcl-2, la cual, previene la apoptosis ⁽¹⁵⁾. El VHH8 también codifica una interleuquina-6 y 3 quimocinas secretadas por las células infectadas, que son capaces de promover la migración y replicación de las células no infectadas ⁽¹⁶⁾. La interleuquina-6 viral es capaz de inducir proliferación de los linfocitos-B y las quimocinas pueden activar la angiogénesis e inhibir las respuestas de las células T-cooperadoras ⁽¹⁷⁾. Friborg y col. ⁽¹⁸⁾, han demostrado que el antígeno nuclear de latencia (LANA) puede interactuar con el gen p53 e inhibir su capacidad de transcripción.

El ADN del VHH8 se puede detectar hasta en el 50 % de las células mononucleares periféricas provenientes de pacientes con SK y en prácticamente todas las lesiones de SK ⁽¹⁰⁾. Los resultados de los estudios serológicos indican que a diferencia de otros herpesvirus, el VHH8 no es ubicuo. La tasa de infección corre paralela a la frecuencia del SK, siendo baja en EE.UU, intermedia en Asia y Europa, y muy alta en África Central. La seroprevalencia del VHH8 entre donantes de sangre es de 0,2 % en Japón donde el SK es muy raro ⁽¹⁹⁾, un 10 % en EE.UU ⁽²⁰⁾, más del 50 % en los países de África ⁽²¹⁾ y un valor intermedio en los países europeos ⁽²²⁾. En los homosexuales, independientemente de la serología para el VIH, la frecuencia de infección

asintomática por el VHH8 puede aproximarse al 40 % ⁽²⁰⁾.

El VHH8 se transmite predominantemente por vía sexual y sobre todo a través de contactos homosexuales. En África, donde la prevalencia del VHH8 es alta, existe transmisión vertical de madre a hijo ⁽²³⁾. La mayoría de las infecciones primarias del VHH8 son asintomáticas, actuando los linfocitos B como santuario, y son controladas por el sistema inmune en el individuo sano ⁽¹⁰⁾.

A partir de la identificación de las secuencias del VHH8, se ha observado que existe un polimorfismo genético del virus dependiendo del área geográfica donde sea identificado ⁽²⁴⁾. Di Alberti y col. ⁽²⁵⁾, utilizando la técnica del polimorfismo conformacional de una cadena, han detectado diferentes patrones de migración del ADN del VHH8 que corresponden a sustituciones de nucleótidos que definen variantes del virus. Ellos analizaron las secuencias correspondientes a un segmento de 210-pb (pares de bases) amplificadas en el frente abierto de lectura (ORF) ⁽²⁶⁾. Se utilizaron 25 muestras de genoma del VHH8 provenientes de tejido de la cavidad oral de pacientes VIH positivos ⁽¹⁰⁾, SK oral ⁽⁵⁾ y SK cutáneo mediterráneo ⁽¹⁰⁾, estas se compararon con 36 secuencias del VHH8 ya estudiadas ^(8,26-28). Los resultados permitieron reunir a las variantes genéticas en 4 grupos principales (A-D) y un grupo misceláneo. Las variantes A y D fueron detectadas exclusivamente en tejidos provenientes de pacientes de África y EE.UU; en cambio, las variantes B y C se detectaron predominantemente en tejidos de pacientes italianos e ingleses ⁽²⁵⁾. Zong y col. ⁽²⁹⁾, estudiaron también la variabilidad genética del genoma del VHH8. Para ello utilizaron muestras provenientes de SK clásico, epidémico y linfomas de cavidades obtenidas de pacientes africanos y norteamericanos. Ellos analizaron las secuencias correspondientes a un segmento de 2500-pb que incluye el ORF 26 y el ORF 75,

y las compararon con las secuencias descritas por Chang y col. ⁽⁸⁾ y Cesarman y col. ⁽²⁸⁾. Los resultados permitieron reunir las variantes genéticas en 3 grupos (A-C). El grupo A predominó en el SK clásico y el B y C se encontraron fundamentalmente en África. Además, observaron que el grupo A predominó en EE.UU, mientras que el grupo C predominó en las formas diseminadas y agresivas africanas.

La discordancia aparente en las 2 clasificaciones utilizadas radica en lo siguiente, Di Alberti y col. ⁽²⁵⁾, utilizaron un segmento pequeño con ORF 26 y sólo consideraron aquellas sustituciones de nucleótidos que precedían cambios en los aminoácidos; en cambio Zong y col. ⁽²⁹⁾, utilizaron un segmento más grande que incluyó ORF 26 y 75 e identificaron todas las sustituciones de nucleótidos, incluyendo las silentes.

La clasificación actual fue propuesta inicialmente en 1989 por el ACTG (AIDS *Clinical Trial Group*) (30), y validada en 1997 ⁽³¹⁾. En ella se pueden separar 2 grupos de pacientes: “bajo riesgo” y “alto riesgo”. Este sistema permite una evaluación más precisa de la extensión de la enfermedad e incluye los 3 factores pronósticos más relevantes: síntomas sistémicos, infección previa por oportunistas y nivel de células CD4. Los pacientes de buen pronóstico (bajo riesgo) son aquellos con enfermedad limitada a piel (menos de 25 lesiones) o ganglios linfáticos y mínima lesión en el paladar (generalmente mácula), CD4 > 200 células / μ L, sin infección previa por oportunistas, ni síntomas B y una escala de Karnofsky \geq 70. Los pacientes de mal pronóstico (alto riesgo) tienen alguna de las siguientes características: edema o ulceración, SK oral extenso, SK gastrointestinal, SK en otra víscera, CD4 < 200 células/ μ L, historia de infección previa por oportunista, síntomas B, escala de Karnofsky < 70 u otras enfermedades asociadas a la infección por el VIH (ej: linfoma, enfermedad neurológica) ⁽³⁰⁾.

Los pacientes con SK extenso en piel, linfedema o enfermedad visceral reciben tratamiento con quimioterapia. Las drogas más activas son: antraciclinas liposomales, doxorubicina, paclitaxel, alcaloides de la vinca y bleomicina ⁽¹⁰⁾. La combinación de doxorubicina, bleomicina y vinblastina ha sido bien tolerada y se han reportado respuestas objetivas en un 88 % de los pacientes ⁽³²⁾; a pesar de estos resultados, esta combinación se ha remplazado por nuevas drogas. Las antraciclinas liposomales son muy efectivas en contra del SK y menos tóxicas que las antraciclinas convencionales. La daunorubicina liposomal administrada cada 2 semanas produce respuestas objetivas entre el 25 % y 62 % ⁽³³⁾. En 1998 Northfelt y col. ⁽³⁴⁾, reportaron los resultados de un estudio fase III comparando la doxorubicina liposomal (DL) con respecto a la combinación de doxorubicina-bleomicina-vincristina (ABV). Ellos encontraron mayores respuestas con la DL (46 % vs. 25 %), y además menor neurotoxicidad. Con la base de los estudios reportados, actualmente la DL es considerada por muchos médicos como la droga de elección para el tratamiento del SK.

Los objetivos del siguiente trabajo son: estudiar el polimorfismo genético del VHH8 en un grupo de pacientes venezolanos con SK de “bajo riesgo”, y demostrar la actividad farmacológica diferencial de la DL en pacientes con SK de “alto riesgo”, gastrointestinal y cutáneo.

MÉTODOS

Los estudios fueron previamente aprobados por el Comité de Ética del Hospital Vargas.

1. Polimorfismo genético del VHH8: Nueve pacientes homo o bisexuales masculinos, entre 23 y 49 años (media: 33 años), con prueba de ELISA y Western blot positivas, y biopsia cutánea confirmatoria de SK se incluyeron en el estudio. Todos los pacientes

pertenecían a grupo de “bajo riesgo”⁽³⁰⁾; tenían < de 25 lesiones cutáneas, \geq 200 linfocitos CD4, sin evidencia de SK visceral ni infección por oportunista previa o concomitante.

- a. Muestras de tejido: Nueve biopsias de lesiones cutáneas de SK, de los pacientes descritos, fijadas con formalina e incluidas en parafina, fueron estudiadas. Se obtuvieron múltiples secciones, entre 30 μ m – 50 μ m de grosor, usando hojillas de micrótopo desechables entre muestras diferentes. El ADN fue extraído de las muestras utilizando el método estándar del fenol/cloroformo⁽³⁵⁾.
- b. Amplificación del ADN: Todas las muestras del ADN fueron susceptibles para ser amplificadas de acuerdo a sondas específicas (primers) ya que conservaron la región del gen que codifica la β -globina^(25,35). El ADN fue amplificado a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con condiciones específicas para el fragmento de 233-bp (KS 330233) que incluye el ORF 26, como fue previamente descrito⁽⁸⁾. Cada reacción de PCR incluyó 1 μ g de ADN genómico, 100 pmol de cada sonda específica (5' –TCCGTGTTGTCTACGTCCAG- 3' y 5' - AGCCGAAAGGATTCC-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) 1 mM y Triton 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. Controles positivos (ADN proveniente de biopsia de SK) y negativos fueron incluidos.

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 tailing 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 sólo si el producto amplificado por la PCR hibridizó en la región del segmento de 233-pb.

- c. Caracterización del polimorfismo del ADN del VHH8: El ADN amplificado del VHH8 fue procesado utilizando un secuenciador Beckman CEQ 2000. Las variaciones en 5 codones permitieron la clasificación en los diversos subtipos de VHH8, de acuerdo a lo descrito por Di Alberti y col.⁽²⁵⁾.
2. Actividad farmacológica diferencial de la DL: Quince pacientes homo o bisexuales masculinos, entre 25 y 35 años (media: 27 años), con prueba de ELISA y Western Blot positivas, y biopsia confirmatoria de SK se incluyeron en el estudio. Todos los pacientes pertenecían al grupo de “alto riesgo”⁽³⁰⁾, tenían más de 25 lesiones cutáneas y SK gastrointestinal extenso. En todos ellos se realizó su historia clínica con cuantificación y medición de las lesiones cutáneas, hematología completa, química sanguínea, conteo de células CD4, Rx. de tórax, gastroscopia y colonoscopia. Los estudios endoscópicos se repitieron al finalizar el

tratamiento para evaluar la respuesta. Ningún paciente había recibido tratamiento previo para el SK. Los pacientes fueron tratados con DL 20 mg/m² en solución de dextrosa al 5 %, 250 mL durante 30 minutos. El tratamiento se repitió cada 21 días, por 6 ciclos. Los criterios para suspender el tratamiento sistémico fueron: progresión de la enfermedad durante el tratamiento, intolerancia o toxicidad, o adquisición de una infección por oportunista. Siete pacientes se encontraban bajo tratamiento con HAART. Para evaluar la respuesta se siguieron los criterios del ACTG ⁽³¹⁾ y modificados por Northfelt y col. ⁽³⁶⁾, en resumen son los siguientes: Respuesta completa (RC): Ausencia de enfermedad, incluyendo el edema asociado al tumor; en pacientes con alguna lesión pigmentada, se le realizó biopsia para documentar la ausencia de células malignas; los estudios endoscópicos deben demostrar ausencia completa del SK y la respuesta debe mantenerse, al menos, durante 4 semanas; respuesta parcial (RP): No aparición de lesiones cutáneas o viscerales nuevas; además, reducción, al menos del 50 %, de las lesiones existentes; y enfermedad estable (EE): No modificación de las lesiones, o una reducción menor del 50 %. Todos los pacientes llenaron los criterios para evaluar en ellos respuesta y toxicidad. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Fisher para cuantificar la respuesta ⁽³⁷⁾.

RESULTADOS

1. Polimorfismo genético del VHH8: Los resultados mostraron la prevalencia del subtipo B en cinco (56 %) de los pacientes. El subtipo C se observó en tres (33 %) de los pacientes y el subtipo A en uno (11 %) (Cuadro 1). En el Cuadro 2 se muestran las secuencias amplificadas de los 9 VHH8 estudiados utilizando un segmento de 233-

pb que incluye el ORF 26.

Cuadro 1. Subtipos del VHH8 en nueve biopsias cutáneas de pacientes con SK asociado al SIDA de “bajo riesgo” identificados con una región genómica de 233-pb que incluye el ORF26

N° de secuencia	N° de biopsia	Subtipo
2	81838	B
3	80892	C
4	82324	C
5	83616	B
6	83694	B
7	80533	C
8	81834	A
9	81755	B
10	79893	B

VHH8: Virus herpes humano tipo 8; SK: Sarcoma de Kaposi; pb: pares de bases; ORF: Frente abierto de lectura.

2. Actividad farmacológica diferencial de la DL: Todos los pacientes tenían < de 200 linfocitos CD4 y un estado general (escala de Karnofsky) ≥ 70. Once (73 %) pacientes alcanzaron RC de las lesiones gastrointestinales y cuatro (27 %) una RP. Con respecto a las lesiones cutáneas, sólo dos (13 %) pacientes lograron una RC, seis (40 %) una RP y siete (47 %) EE (Cuadro 3). Al comparar la respuesta de la DL de acuerdo a la ubicación de las lesiones, observamos una mayor efectividad (P < 0,00035) de la DL en el SK gastrointestinal. No hubo toxicidad grado 3 ⁽³⁸⁾ atribuible al uso de la DL.

DISCUSIÓN

Los estudios de la variabilidad genética de diferentes VHH8 utilizando diferentes ORF, han permitido obtener alguna información sobre el origen, evolución genética, transmisibilidad

Cuadro 2. Secuencias genéticas de los nueve VHH8 identificados con una región genómica de 233-pb que incluye el ORF26

>2hhv8

TTAGCCGAAAGGATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATTTGACATCGTGTTCCTCCATGGTCGTGCCT
CAGCAACTGGGGCAGCTATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATCTACTCCAaAATATCGGCCGGG
GCCCCGGGTGATGTCAATATGGCGGAACTTGATCTATATACCACCaATGTgTCATTTAtGGGGCGCACA
TATCGTCTGGACGTAGACAACACGGAA

>3hhv8

GTgCTCgAATCCAACGGATTTGACCTCGTGTTCCTCCATGGTCgTGCCGCAGCAACTGGGGCAGCT
ATTCTGCAGCAGTTGTTGGTGTACCACATCTACTCCAAAATATCGGCCGGGGCCCCGGATGATGTCaATA
TGGCGGAACTTGATCtATATACCACCAATGTGTcATTTATGGGGCGCACATATCGTCTGGACGTAGACAACACGGAA

>4hhv8

TAGCCGAAAGgATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATTTGACCTCGTGTTCCTCCATGGTCGTGCC
GCAGCAACTGGGGCAGCTATTCTGCAGCAGTTGTTGGTGTACCACATCTACTCCAAAATATCGGCCGGGGCCCCGGATGA
TGTCaATATGGCGGAACTTGATCtATATACCACCAATGTGTcATTTATGGGGCGCACATATCGTCTG
GACGTAGACAACACGGAA

>5hhv8

TTAGCCGAAAGGATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATTTGACATCGTGTTCCTCCATGGTCGTGCCTCAGCAACTGGGGCAC
GCTATtCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATCTACTCCaaAATATCGGCCGGGGCCCCGGGTGATGTCAATATGG
CGGAACTTGATCTATATACCACCAATGTGTcATTTATGGGGCGCACATATCGTCTGGACGTAGACAACACGGAA

>6hhv8

TGAGCCGAAAGgATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATTTGACATCGTGTTCCTCCATGGTCGTGCCTC
AGCAACTGGGGCAGCTATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATCTACTCCAAAATATCGGCCGGGG
GCCCCGGGTGATGTCAATATGGCGGAACTTGATCtATATACCACCAATGTGTcATTTATGGGGCGCAcA
TATCGTCTGGACGTAGACAACACGGAA

>7hhv8

AGCCGAAAGGATTCCACCATTGTGCTcGAATCCAACGGATTTGACCTCGTGTTCCTCCATGGTCgTGCCGC
AGCaACTGGGGCAGCgTATTCTGCaGCAGTTGTTGGTGTACCACATCTACTCCaAAATATCGGCCGGGGCCCCG
GATGATGTCAATATGGCGGAACTTGATCtATATACCACcCAATGTGTcATTTATGGGGCGCACATATCG
TCTGGACGTAGACAACACGGAA

>8hhv8

AGCCGAAAGgATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATTTGACCTCGTGTTCCTCCATGGTCGTGCC
GCAGCAACTGGGGCAGCTATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATCTACTCCAAAATATCGGCC
GGGGCCCCGGATGATGTaAATATGGCGGAACT
TTGATCtATATACCACCAATGTGTcATTTATGGGGCGCACATAtcgTCtgGACGTAGACAACACGGAA

>9hhv8

AGCCGAAAGGATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATtTgACaTCGTGTTCCTCCATGGTCGTGCCGCAgC
AACTGGGGCAGCtAtTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATCTACTCCaaAATATCGGCCGGGGCCCC
GGgTGATGTCaATATGGCGGAACTtGATCTATATACCACCaATGtgTCaTtAtGGgGCGCACATATCGTC
TGGACGTAgACAACACGGAA

>10hhv8

TaGCCGAAAGGATTCCACCATTGTGCTCGAATCCAACGGATTTGACATCGTGTTCCTCCATGGTCGTGC
CTCAGCaACTGGGGCAGCTATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTACCACATCTACTCCaAAATATCGGCCGGGG
CCCCGGGTGATGTCAATATGGCGGAACTTgATCTATATACCACCAATGTGTcATTTATGGGGgCCACAt

VHH8: Virus herpes humano tipo 8; ORF: Frente abierto de lectura.

Cuadro 3. Respuesta al tratamiento en quince pacientes con SK gastrointestinal extenso y más de veinticinco lesiones cutáneas.

Respuesta	SK gastrointestinal	Lesiones cutáneas
Completa	11 (73 %)	2 (13 %)
Parcial	4 (27 %)	6 (40 %)
Enfermedad estable	-	7 (47 %)

SK: Sarcoma de Kaposi; n: número de pacientes; %: porcentaje.

y asociación con enfermedad del virus ^(24,39). En ellos se han incluido muestras de pacientes con diferentes formas clínicas del SK provenientes de África, Europa y América. Los ORF utilizados más frecuentemente para identificar las variaciones en los nucleótidos, y permitir las clasificaciones descritas, son el ORF 26 y el 75 ^(25,29). Otros autores ⁽³⁹⁾, consideran que se deben utilizar para evaluar el polimorfismo genético, otras regiones genómicas más variables localizadas en ambos extremos del genoma del VHH8, tales como los frentes abiertos de lectura ORFK1 y el ORFK5. Nosotros utilizamos para realizar nuestros ensayos la metodología descrita por Dupon y col. ⁽³⁵⁾ y Di Alberti y col. ⁽²⁵⁾, tomando como punto de referencia una región genómica de 233-pb que incluyó el ORF 26. Esto nos permitió utilizar nuestros resultados para compararlos con otras series de VHH8 provenientes de otras regiones del mundo. Caterino-de-Araujo ⁽⁴⁰⁾, estudió las secuencias genéticas del VHH8 en 7 pacientes con SK provenientes de Sao Paulo, y encontró que se pueden clasificar en el subtipo B y C; además, es importante puntualizar que 6 de ellos eran originarios de Europa. Las características genéticas de nuestro grupo es similar al descrito por Caterino-de-Araujo ⁽⁴⁰⁾, ya que el 89 % de los VHH8 identificados pertenecían al subtipo B y C; sin embargo, ninguno de nuestros pacientes tenían ascen-

dencia europea sino representaban una población mestiza, mezclada durante varias generaciones de inmigrantes españoles, negros africanos y población indígena autóctona. Fouchard y col. ⁽²⁴⁾, estudiaron las secuencias genéticas del VHH8 en 17 pacientes negros con SK provenientes de África Central, Occidental y Guayana Francesa. Al utilizar la región genómica de 233- pb que incluyó el ORF 26, todos los VHH8 se clasificaron en los subtipos B y C, similar a los resultados nuestros. Boralevi y col. ⁽⁴¹⁾, reportaron la variabilidad genética del VHH8 en 48 pacientes con SK provenientes de Bordeaux (Francia). En este grupo predominó el subtipo B (53 %) y el A (39 %); Zong y col. ⁽²⁹⁾, estudiaron 43 pacientes con SK provenientes de EE.UU; ellos encontraron una predominancia del subtipo A (79 %) del VHH8. Observamos con estos resultados que los subtipos B y C predominan en África y Sudamérica; en cambio, el subtipo A es más frecuente en EE.UU, y los subtipos B y A predominan en Francia. Todos estos datos refuerzan aún más la posibilidad de una relación geográfica entre los diferentes subtipos del VHH8, que una relación étnica. Como hipótesis se podría plantear, que los subtipos B y C son oriundos de África y penetraron con mayor frecuencia en Sudamérica; además, que el subtipo A probablemente se originó en EE.UU. y/o Europa. Con referencia a la variabilidad genética, encontramos que todas las series estudiadas muestran diferentes subtipos del VHH8, aunque en diferentes proporciones. Actualmente no existen muchos reportes de la relación de los subtipos del VHH8 y los diferentes tipos clínicos del SK. Boralevi y col. ⁽⁴¹⁾, han encontrado mayor frecuencia de lesiones mucosas y viscerales en pacientes con SK y el subtipo A al compararlos con los subtipos B y C (62,5 % en A vs. 27 % en B; $P < 0,05$). Nuestros pacientes pertenecían al grupo de “bajo riesgo” con solamente lesiones cutáneas, y los VHH8 se incluyeron predominantemente (89 %) en los subtipos B y C. Aunque nuestro grupo es pequeño, observamos una evolución

clínica relativamente benigna, sin compromiso de la vida de los enfermos atribuible al SK, posiblemente relacionada a la predominancia de los subtipos B y C del VHH8. Mayores estudios en los países latinoamericanos serán necesarios para precisar la epidemiología molecular del VHH8 en este subcontinente y así poder definir la relevancia de los subtipos en las diferentes formas clínicas del SK.

El SK es la neoplasia más común en los pacientes con SIDA y, hasta 1994 ⁽³⁾ algunas cohortes de homosexuales, tenían un 50 % de riesgo de presentar SK durante su vida. Con la introducción del HAART a partir de 1996, se ha observado una disminución de los casos de SK (4); sin embargo, en los países del tercer mundo donde no se ha incorporado de una manera extensa el uso del HAART, el SK continúa siendo frecuente en los pacientes con SIDA, sobre todo las formas viscerales ⁽⁵⁾, las cuales, pueden comprometer la vida de estos enfermos. La DL ha sido considerada la droga de elección para el tratamiento del SK debido a su efectividad (50 % respuesta global) ⁽³⁴⁾; sin embargo, en los países subdesarrollados no se ha extendido su uso debido al alto costo. Esquemas de tratamiento más económicos, como el ABV, han sido utilizados con más auge en nuestros países con un excelente beneficio clínico (60 % - 100 %) ⁽⁴²⁾. Para poder justificar el uso de la DL, debemos demostrar su efectividad en un grupo de pacientes con SK de

“alto riesgo” y con alto peligro de muerte por las complicaciones. Es por ello que realizamos un estudio prospectivo en pacientes con SK gastrointestinal extenso tratados con DL y además, comparamos su efectividad con respecto a las lesiones cutáneas. No encontramos en la literatura un estudio similar que evalúe la efectividad de la DL en lesiones viscerales extensas en comparación con lesiones cutáneas. Nosotros demostramos la acción diferencial de la DL siendo altamente efectiva en las lesiones gastrointestinales del SK, con lo cual, disminuimos el riesgo de muerte por sangrado masivo. Con respecto a la toxicidad, Northfelt y col. ⁽³⁴⁾, han reportado toxicidad hematológica y mucosa grado 3 en el 49 % y 5 % de los pacientes respectivamente; en cambio, en nuestro estudio no encontramos toxicidad grado 3 que ameritara reducción de dosis, administración de factores estimulantes de granulocitos o retraso en los ciclos. Lo que hace esta diferencia radica en el intervalo entre los ciclos, nosotros los administramos cada 21 días, en cambio en el trabajo de Northfelt y col. ⁽³⁴⁾, se administraron cada 15 días.

Finalmente, podemos concluir que la DL tiene una acción farmacológica diferencial siendo altamente efectiva en lesiones gastrointestinales; y además, podemos justificar su uso en pacientes provenientes de países del tercer mundo con SK gastrointestinal extenso y riesgo de sangrado masivo.

REFERENCIAS

1. Safai B, Weiss H. Clinical manifestations of Kaposi's sarcoma. En: Ma P, Armstrong D, editores. The acquired immune deficiency syndrome and infections of homosexual men. Nueva York: Yorke Medical, Tech. Pub; 1984.p.210-224.
2. Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: A sexually transmitted infection?. Lancet. 1990;335(8682):123-128.
3. Katz MH, Hessol NA, Buchbinder SP, Hirozawa A,

- O'Malley P, Holmberg SD. Temporal trends of opportunistic infections and malignancies in homosexual men with AIDS. *J Infect Dis.* 1994;170(1):198-202.
4. Jacobson LP, Yamashita TE, Detels R, Margolick JB, Chmiel JS, Kingsley LA, et al. Impact of potent antiretroviral therapy on the incidence of Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphomas among HIV-1 infected individuals. Multicenter AIDS cohort study. *Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;21(Suppl 1):34-41.
 5. Hernández DE, Hernández AE, Hernández FE, Márquez G. AIDS related malignancies: Clinical and epidemiologic features in venezuelan patients. *JAIDS.* 2000;23:A19.
 6. Ensoli B, Barullair G, Gallo RC. Pathogenesis of AIDS associated Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991;5(2):281-295.
 7. Friedman-Kien AE. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *J Am Acad Dermatol.* 1981;5(4):468-471.
 8. 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(5192):1865-1869.
 9. Hernández DE, Pellino ML, Ramírez B. Acute myelocytic leukemia associated with Kaposi's sarcoma in a patient without serum antibodies to human immunodeficiency virus type 1. *Br J Dermatol.* 1996;134(3):551-554.
 10. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 2000;342(14):1027-1038.
 11. Moore PS, Gao SJ, Domínguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 1996;70(1):549-558.
 12. Hayward GS. KSHV strains: The origins and global spread of the virus. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(3):187-199.
 13. Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14862-14867.
 14. Chang Y, Moore PS, Talbot SJ, Boshoff CH, Zarkowska T, Godden-Kent, et al. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature.* 1996;382(6590):410.
 15. Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS, et al. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):690-694.
 16. Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, Chang Y. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science.* 1996;274(5293):1739-1744.
 17. Stine JT, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, et al. KSHV-encoded CC chemokine is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood.* 2000;95(4):1151-1157.
 18. Friberg J Jr, Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature.* 1999;402(6764):889-894.
 19. Fujii T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, et al. Seroprevalence of human herpes-virus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J Med Virol.* 1999;57(2):159-162.
 20. Miller G, Rigsby MO, Heston L, Grogan E, Sun R, Metroka C, 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(20):1292-1297.
 21. Sitas F, Carrara H, Beral V, Newton R, Reeves G, Bull D, et al. Antibodies against human herpesvirus 8 in blacks South African patients with cancer. *N Engl J Med.* 1999;340(24):1863-1871.
 22. Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(5):395-397.
 23. 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(14):948-954.
 24. Fouchard N, Lacoste V, Couppie P, Develoux M, Maclere 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(2):166-170.
 25. Di Alberti L, Ngui SL, Porter SR, Speight PM, Scully CM, Zakrewska JM, et al. Presence of human herpesvirus 8 variants in oral tissues of human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis.* 1997;175(3):703-707.
 26. 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(18):1181-1185.
27. Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, Poiesz B, Katabira E, Zhang WC, et al. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 1995;345(8952):759-761.
 28. Cesarman E, Moore PS, Rao PH, Inghirami G, Knowles DM, Chang Y. In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood.* 1995;86(7):2708-2714.
 29. Zong JC, Metroka C, Reitz MS, Nicholas J, Hayward GS. Strain variability among Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genomes: Evidence that a large cohort of United States AIDS patients may have been infected by a single common isolate. *J Virol.* 1997;71(3):2505-2511.
 30. Krown SE, Metroka C, Werns JC. Kaposi's sarcoma in the acquired immune deficiency syndrome: A proposal for uniform evaluation, response, and staging criteria. AIDS Clinical Trials Group Oncology Committee. *J Clin Oncol.* 1989;7(9):1201-1207.
 31. Krown SE, Testa MA, Huang J. AIDS-related Kaposi's sarcoma: Prospective validation of the AIDS Clinical Trials Group staging classification. AIDS Clinical Trials Group Oncology Committee. *J Clin Oncol.* 1997;15(9):3085-3092.
 32. Gill PS, Rarick M, McCutchan JA, Slater L, Parker B, Muchmore E, et al. Systemic treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: Results of a randomized trial. *Am J Med.* 1991;90(4):427-433.
 33. Gill PS, Wernz J, Scadden DT, Cohen P, Mukwaya GM, von Roenn JH, et al. Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol.* 1996;14(8):2353-2364.
 34. Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, Miller BJ, Fischl MA, Friedman-Kien A, et al. Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: Results of a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol.* 1998;16(7):2445-2451.
 35. Dupon M, Masquelier B, Cazorla C, Chene 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(6):417-425.
 36. Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, Levine R, Von Roenn JH, Dosik GM, et al. Efficacy of pegylated-liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma after failure of standard chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1997;15(2):653-659.
 37. Zar JH. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall 1974; p. 291-295.
 38. National Cancer Institute: Common toxicity criteria. Bethesda, MD, National Cancer Institute, 1998.
 39. Schultz TF. Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Gen Virol.* 1998;79(Pt 7):1573-1591.
 40. Caterino-de-Araujo A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1998;177(4):1136-1137.
 41. Boralevi F, Masquelier B, Denayrolles M, Dupon M, Pellegrin JL, Ragnaud JM, et al. 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(5):1546-1547.
 42. Hernández DE, Marín ME, Pérez JR. Sarcoma de Kaposi epidémico avanzado: Beneficio clínico con el régimen doxorubicina-bleomicina-vincristina. *Rev Fac Med,* 2001;24(2):185-188.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración prestada por el Dr. Bernard Masquelier, Laboratorio de Virología Sistemática y Molecular, Hospital Pellegrin, Bordeaux, Francia; Dr. Mario Comegna, Sociedad Venezolana de Infectología; Dra. Margarita Oliver, Dermopatología, Instituto de Biomedicina, UCV; Dra. Omidres Pérez, Servicio de Medicina 2, Hospital Vargas; Dr. Rafael Borges, Epidemiólogo, Instituto de Biomedicina, UCV; y Dra. Erika Castro, Instituto de Inmunología, UCV.