



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL
HERPES VIRUS HUMANO TIPO 8 EN
PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI
EPIDÉMICO (VIH+) Y SARCOMA DE
KAPOSI CLÁSICO (VIH-)”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN CONTROL DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y TROPICALES

SALIM MOHANNA BARRENECHEA

LIMA - PERÚ

2010

ASESOR

Dr. Eduardo Gotuzzo Herencia

JURADO DE TESIS

DR. CESAR PAUL EUGENIO CARCAMO CAVAGNARO

PRESIDENTE

DR. PEDRO ESTEBAN LEGUA LEIVA

VOCAL

DRA. FRINE SAMALVIDES CUBA

SECRETARIA

DEDICATORIA

A mi asesor, Dr. Eduardo Gotuzzo, continua fuente de inspiración
y a quien considero un mentor y ejemplo de dedicación.

AGRADECIMIENTO

A mis padres, por su eterno apoyo.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El presente estudio fue realizado siendo becario del proyecto Phase II International Clinical, Operational and Health Services Research Training Award for AIDS and Tuberculosis (ICOHRTA-AIDS/TB) financiado por el National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL HERPES VIRUS HUMANO TIPO 8 EN PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI EPIDÉMICO (VIH+) Y SARCOMA DE KAPOSI CLÁSICO (VIH-)

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	www.upch.edu.pe Fuente de Internet	7%
2	docplayer.es Fuente de Internet	1%
3	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	pt.scribd.com Fuente de Internet	1%
5	www.unisanitas.edu.co Fuente de Internet	1%
6	list.waikato.ac.nz Fuente de Internet	1%
7	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
8	María Laura Hulaniuk, Laura Mojsiejczuk, Federico Jauk, Carlos Remondegui et al. "Genetic diversity and phylogeographic	< 1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	MATERIALES Y METODOS.....	3
III.	RESULTADOS.....	5
IV.	DISCUSION.....	7
V.	CONCLUSIONES.....	9
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	10
VII.	ANEXO	

RESUMEN

El herpes virus humano-8 (HVH-8) es considerado el agente etiológico de las cuatro variantes clínicas del sarcoma de Kaposi (SK). El objetivo del presente estudio fue describir los subtipos del HVH-8 presentes en pacientes con SK epidémico y SK clásico atendidos en el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” y en el Hospital Nacional Cayetano Heredia.

Se realizó un estudio trasversal, donde se emplearon los bloques de parafina con diagnóstico histopatológico confirmado de SK epidémico y SK clásico. De los 36 bloques de parafina, se obtuvo suficiente cantidad de ADN en 30 de ellos, pero sólo se pudo determinar un subtipo en 25 casos. La amplificación del gen K1 del HVH-8 fue mediante PCR-anidado. El análisis de las secuencias mostró que 14 casos correspondían al subtipo C, ocho casos al subtipo A (incluyendo un A5), un caso al subtipo B y dos casos al subtipo E.

Concluimos que nuestro país presenta una gran diversidad de subtipos del HVH-8 como consecuencia de diversos factores históricos, sociales y culturales. Se ha detectado por primera vez el subtipo E a partir de una lesión de SK, demostrando que es capaz de producir tal lesión.

PALABRAS CLAVE

Herpes virus humano 8; HVH-8; sarcoma de Kaposi; epidemiología molecular; Peru.

ABSTRACT

Human herpes virus-8 (HHV-8) is considered the etiological agent of all four clinical variants of Kaposi sarcoma (KS). The aim of the present study was to describe HHV-8 subtypes on epidemic and classic KS specimens from patients attended at the Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” and at Hospital Nacional Cayetano Heredia. A cross-sectional study was performed, based on paraffin blocks with confirmed histopathological diagnosis of epidemic and classic KS. Thirty six blocks were obtained. Enough DNA was obtained from 30 of them, but only 25 cases could be genotyped. Nested-PCR was used for K1 gen amplification. Sequence analysis showed that 14 cases correspond to subtype C, eight cases to subtype A (including one A5), one case to subtype B, and two cases to subtype E. We conclude that our country presents a high diversity of HHV-8 subtypes as a consequence of diverse historical, social, and cultural factors. We have obtained the E subtype for the first time from a KS lesion, showing that it is capable of producing such lesions.

KEY WORDS

Human herpes virus 8; HHV-8; Kaposi sarcoma; molecular epidemiology; Peru.

I. INTRODUCCIÓN

La prevalencia mundial del sarcoma de Kaposi (SK) se ha incrementado y el número de casos fue estimado alrededor de 65,000 en el 2002, representando el 1% de todos los casos de cáncer diagnosticados [1]. El herpes virus asociado al SK, también conocido como herpes virus humano-8 (HVH-8), es considerado como el agente etiológico de las cuatro variedades de SK [2-3]. Esta neoplasia se presenta frecuentemente durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (SK epidémico) y en pacientes órgano-trasplantados (SK iatrogénico). El SK también puede desarrollarse en personas sin la infección por el VIH, como adultos y niños del Este y Centro de África (SK endémico), o en adultos mayores del Mediterráneo, del Medio Oriente y América del Sur (SK clásico) [2-3].

La genotipificación del gen ORF K1 del HVH-8 ha permitido la identificación de 5 subtipos moleculares (A, B, C, D y E), con una distribución mundial que se correlaciona con la ancestría y el área geográfica [4]. Así, los subtipos A y C predominan en Europa, países del Mediterráneo, Estados Unidos y algunas partes de Asia; el subtipo B predomina en África subsahariana; el subtipo D se encuentra principalmente en Oceanía; y, el subtipo E se ha reportado exclusivamente en indígenas amazónicos de Brasil, Ecuador y Guyana Francesa [5-9]. Actualmente, el SK ha sido reportado en pacientes infectados por todos los subtipos del HVH-8, excepto el subtipo E.

Recientemente se ha demostrado que el HVH-8 presenta una alta prevalencia en nuestro medio [10]. Asimismo, la incidencia del SK clásico y epidémico es elevada en comparación con los demás países de la región. En Perú, el SK presenta características clínicas y

epidemiológicas especiales, habiendo sido descrito en el amplio abanico multiétnico de nuestra población [11-15].

El objetivo principal del estudio fue determinar los subtipos del HVH-8 presentes en una serie de casos de SK clásico y epidémico.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 36 bloques de parafina del departamento de Patología del Hospital Nacional Cayetano Heredia (HNCH) diagnosticados como SK entre 1989 y el 2002. Adicionalmente, se recolectó la información epidemiológica disponible (género, edad, raza, características clínicas de las lesiones, y status de infección por el VIH) en los archivos de patología y en las historias clínicas.

Los bloques de parafina fueron coloreados con hematoxilina/eosina para su revisión. Asimismo, se les realizaron pruebas de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti-CD34 y contra el antígeno nuclear de latencia (LANA ORF73), siguiendo el procedimiento descrito por Hbid [16].

Se extrajo ADN de alto peso molecular de los bloques de parafina con el kit QIAamp DNA (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Para prevenir el riesgo de contaminación durante los procedimientos, se realizó la extracción del ADN, la preparación de las mezclas y el PCR, en tres ambientes separados. La infección por HVH-8 se determinó mediante PCR-anidado para la amplificación de las regiones VR1 y VR2 del gen ORF K1 [17]. Para la región VR1 se realizó el primer PCR con el par de cebadores VR1S (ATCCTTGCCAAYATCCTGGTATTGBAA) /VR1AS1 (ACGATTTGACAGGCGAGACGACAGC) para la amplificación de un fragmento de 373-pb, seguido de un PCR-anidado con el par de cebadores VR1S/VR1AS2 (ACAATRCAAAGTAACABGCTGRCC) para la amplificación de un fragmento de 220-pb. Para la región VR2 se realizó el primer PCR con el par de cebadores VR2S (TCTCGCCTGTCAAATCBTMTATGT)/ VR2AS1

(AGTACCAMTCCACTGGTTGYGTAT) para la amplificación de un fragmento de 314-pb, seguido de un PCR-anidado con el par de cebadores VR2S/VR2AS2 (AGTTCCTAMGATAACCAMACATGGTT) para la amplificación de un fragmento de 240-pb. Los productos amplificados del PCR cuyo tamaño fue el apropiado, fueron purificados del gel, clonados y secuenciados, según lo descrito por Lacoste [18]. Las secuencias fueron verificadas en ambas hebras del ADN.

Se generó un árbol filogenético con el método Neighbor Joining (programa PAUP v4.0b10) con el mejor alineamiento de 165-pb de la región VR1. Adicionalmente a las 25 secuencias generadas en el presente estudio, se emplearon 54 secuencias de nucleótidos del HVH-8 obtenidas a partir de GenBank. Las secuencias fueron alineadas con el programa DAMBE y para seleccionar el mejor modelo, la alineación final se realizó con el programa Model Test (v3.6) según criterios de información de Akaike (AIC). El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y del HNCH.

III. RESULTADOS

El análisis histopatológico e inmunohistoquímico confirmó el diagnóstico de SK en los 36 bloques de parafina, encontrándose la característica infiltración de células fusiformes en todos ellos y siendo positivos para CD34 y/o LANA. Sin embargo, se obtuvo una cantidad suficiente de ADN en 30 de ellos y sólo se pudo determinar un subtipo en 25 de los casos (Tabla 1). De los 25 casos genotipificados, 10 fueron SK epidémicos (asociados al SIDA), mientras que los otros 15 fueron SK clásico.

Con el primer PCR, se evidenció una banda del tamaño esperado en 12 casos para la región VR1 (VR1-externo) y en 4 casos para la región VR2 (VR2-externo). Durante el PCR- anidado, se evidenció una banda en 25 casos para la región VR1 (VR1-interno) y en 17 casos para la VR2 (VR2-interno). Luego de clonar y secuenciar las bandas obtenidas se pudo determinar un subtipo en los 25 casos. El análisis de las secuencias mostró que 14 casos correspondían al subtipo C, ocho casos al subtipo A (incluyendo un A5), un caso al subtipo B y dos casos al subtipo E. De las 25 secuencias obtenidas, 16 fueron únicas, el resto formaron tres grupos de secuencias idénticas.

Las 25 nuevas secuencias de la región VR1-interno exhibieron una divergencia de 0% a 24% a nivel nucleotídico y de 0% a 43% a nivel de aminoácidos al compararlas por pares. La divergencia de nucleótidos entre los dos nuevos subtipos E fue de alrededor de 7% al combinar las regiones VR1-externo y VR2-interno (536-pb) y alcanzó el 10% a nivel de aminoácidos.

El análisis filogenético confirmó la comparación de secuencias y a partir de las 25 nuevas secuencias obtenidas de la región VR1, localizó a 22 de ellas dentro de los subtipos A/C (8 del subtipo A). Las tres secuencias restantes se agruparon claramente en el subtipo africano B y en el subtipo amerindio E (Figura 1).

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio se han genotipificado los subtipos moleculares del HVH-8 a partir de bloques de parafina de pacientes peruanos con SK. Como es característico con bloques de parafina, el ADN obtenido no fue de óptima calidad, lo cual se evidenció durante la migración electroforética en gel de agarosa y por la dificultad para obtener una banda de β - globina. Esta limitación con la que se topan diversos estudios epidemiológicos refuerza la necesidad e importancia de contar con un banco de tejidos, especialmente en escenarios como el nuestro.

Al estudiar el gen K1 del HVH-8, hemos podido demostrar una importante diversidad de subtipos. Es así, que hemos detectado los subtipos A, B, C y E, con excepción del subtipo Melanesio/Polinesio D. La diversidad de nuestros hallazgos no es del todo inesperada debido a la amplia diversidad étnica que caracteriza a la población peruana. Esquemáticamente, podemos decir que inicialmente se dio la introducción de los paleo-indios por el litoral del continente sudamericano durante el periodo Lítico [19], posiblemente infectados con el subtipo E. Muchos siglos después, se dio el proceso de colonización español seguido de un constante y considerable flujo de migrantes europeos, posiblemente infectados con los subtipos A y C. Posteriormente, se produjo el tráfico de esclavos traídos de África, posiblemente infectados con los subtipos A5 y B [20]. Finalmente, el complejo y continuo proceso de migración y mestizaje durante los últimos siglos se han encargado de eliminar las barreras poblacionales que puedan haber existido para el HVH-8 [20, 21].

En Brasil y Guyana Francesa se ha descrito una diversidad similar de subtipos del HVH-8 [6], sin embargo, existen dos características únicas que evidencia nuestro estudio las cuales

son sumamente importantes. Primero, a diferencia de Brasil y Guyana Francesa donde los subtipos descritos guardan relación directa de ancestría (el subtipo B en descendientes africanos, el subtipo A y C en descendientes europeos, y el subtipo E en Amerindios amazónicos) [5-7, 9], nuestro estudio muestra los diversos subtipos en mestizos, migrantes andinos o en sus descendientes, muy probablemente por los procesos de migración y mestizaje, habiendo constituido procesos sociales con un carácter histórico estructural. Segundo, el subtipo E fue obtenido en Brasil y Guyana Francesa exclusivamente a partir de muestras de sangre de amerindios amazónicos. Estos hallazgos han llevado a algunos autores a pensar en la posibilidad de una menor virulencia del subtipo E, debido a que no ha podido ser obtenido a partir de un SK. Nuestro estudio demuestra claramente y por primera vez, la presencia del subtipo E en dos lesiones de pacientes con SK, por lo que se descarta la hipótesis de menor virulencia. Adicionalmente, haber obtenido el subtipo E a partir de dos pacientes infectados con el VIH, nos reafirma el singular escenario que tenemos en Perú, donde la contribución de los movimientos migratorios en la redistribución de la población en nuestro territorio alcanza niveles particulares en la región.

Históricamente sabemos que para los Andes y la Selva, las ocupaciones territoriales se habrían dado de manera simultánea con otras zonas geográficas de América del Sur (selva de Brasil, llanos venezolanos), a través de una oleada paralela de ocupación continental. Coincidentemente, los subtipos E encontrados en el presente estudio se encuentran más cercanos a los subtipos Amerindios de Brasil (Kat, Sio, Wai, Tir y Tupi) que a los de Ecuador (Hua1, Hua2 and Hua3) o los de Guyana Francesa (Wagu), como se puede apreciar en la Figura 1.

V. CONCLUSION

Podemos concluir que nuestro país presenta una gran diversidad de subtipos del HVH-8 como consecuencia de diversos factores históricos, sociales y culturales. Se ha detectado por primera vez el subtipo E a partir de una lesión de SK, demostrando que dicho subtipo es capaz de producir SK. Asimismo, hemos demostrado que el subtipo E no se encuentra concentrado en grupos poblacionales específicos (indígenas amazónicos) como ha sido descrito en otros países de la región, detectándolo en pacientes mestizos de la costa. Estos hallazgos nos reafirman la necesidad de continuar con estudios similares para consolidar y obtener nuevos conocimientos sobre la distribución, patogénesis y epidemiología/antropología genética de la infección por HVH-8 en poblaciones del país y la región.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006;118:3030-44.
2. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA and Lukac DM. Molecular Genetics of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Epidemiology and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:175-212.
3. Schulz TF. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol* 2006;208:187-98.
4. Hayward GS, Zong JC. Modern evolutionary history of the human KSHV genome. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;312:1-42.
5. Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC and Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 2000;181:1562-8.
6. Kazanji M, Dussart P, Duprez R, et al. Serological and Molecular Evidence That Human Herpesvirus 8 Is Endemic among Amerindians in French Guiana. *J Infect Dis* 2005;192:1525-9.
7. Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, et al. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol* 2004;85:155-63.
8. de Souza VA, Sumita LM, Nascimento MC, et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon

region. *J Infect Dis* 2007;196:844-52.

9. Ishak Mde O, Martins RN, Machado PR, et al. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in the Amazon region of Brazil: evidence of an ancient human infection. *J Med Virol* 2007;79:1537-44.

10. Mohanna S, Portillo JA, Carriquiry G, et al. Human herpesvirus-8 in Peruvian blood donors: a population with hyperendemic disease? *Clin Infect Dis* 2007;44:558-61.

11. Mohanna S, Ferrufino JC, Sánchez J, Bravo F, Gotuzzo E. Epidemiological and clinical characteristics of Classic Kaposi's Sarcoma in Peru. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53(3):435-441.

12. Mohanna S, Maco V, Bravo F, Gotuzzo E. Epidemiology and Clinical Characteristics of Classic Kaposi's Sarcoma, Seroprevalence, and Variants of Human Herpes Virus 8 in South America: A Critical Review of an Old Disease. *Int J Infect Dis* 2005; 9(5):239-250.

13. Mohanna S, Echaíz JF, Ferrufino JC, Bravo F, Gotuzzo E. Perfil del Sarcoma de Kaposi Clásico y Epidémico: Estudio Retrospectivo en el Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Folia Dermatol* 2006; 17(3):111-117.

14. Mohanna S, Maco V, Gown A, Morales D, Bravo F, Gotuzzo E. Is Classic Kaposi's Sarcoma Endemic in Peru?: Report of a case in an indigenous patient. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(2):324-326.

15. Mohanna S, Bravo F, Ferrufino JC, Sanchez J and Gotuzzo E. Classic Kaposi's sarcoma presenting in the oral cavity of two HIV-negative Quechua patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E365-8.

16. Hbid O, Belloul L, Fajali N, et al. Kaposi's sarcoma in Morocco: a pathological study

with immunostaining for human herpesvirus-8 LNA-1. *Pathology* 2005;37:285-292.

17. Kadyrova E, Lacoste V, Duprez R, 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;71:548-56.

18. Lacoste V, Judde JG, Briere J, 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* 2000;278:60-74.

19. Fuselli S, Tarazona-Santos E, Dupanloup I, et al. Mitochondrial DNA Diversity in South America and the Genetic History of Andean Highlanders. *Mol Biol Evol* 2003;20(10):1682-91.

20. Quintanilla T. Migración, género y derechos humanos en el Perú. *Revista Aportes Andinos* N° 7. Globalización, migración y derechos humanos 2003.

21. Torero A. *El quechua y la historia social andina*. Lima, Universidad Ricardo Palma. 240 p., 1974.

VII. ANEXOS

Tabla 1. Características epidemiológicas y subtipos moleculares del HVH-8.

#	Código	Género	Edad	Raza	Tipo de Lesión	Número de Lesiones	Lugar de Biopsia	VIH	Infiltración de células fusiformes	CD34	LANA	VR1 externo	VR1 interno	VR2 externo	VR2 interno	Subtipo	Tipo de SK
1	04492	F	34	mestizo	mácula	múltiple	cara	+	+++	++	++	A	A	-	A	A	epidémico
2	06758	M	37	mestizo	nódulo	1	párpado	+	+	++	+/-	-	A	-	-	A5	epidémico
3	04489	M	32	mestizo	mácula	1	paladar	+	++	++	++	-	B	-	B	B	epidémico
4	04484	M	29	mestizo	nódulo	múltiple	nariz	+	+++	++	++	C	C	-	-	C	epidémico
5	04485	M	29	mestizo	nódulo	múltiple	cabeza	+	+++	++	+	C	C	-	C	C	epidémico
6	04497	M	32	mestizo	parche	múltiple	tórax	+	+++	++	++	-	C	-	*	C	epidémico
7	06749	F	35	mestizo	mácula	múltiple	paladar	+	+	+	+	C	C	-	-	C	epidémico
8	06750	M	35	mestizo	nódulo	múltiple	paladar	+	++	+	++	-	C*	-	-	C	epidémico
9	04480	M	51	mestizo	nódulo	1	cuello	+	++	++	++	E	E	-	E	E	epidémico
10	06772	M	24	mestizo	nódulo	múltiple	brazo	+	+	+	+	E	E	E	E	E	epidémico
11	04498	M	75	quechua	nódulo	1	pie	-	+++	++	++	A	A	A	A	A	clásico
12	06739	M	46	mestizo	parche	múltiple	brazo	-	+	++	++	-	A	-	A	A	clásico
13	06741	M	30	mestizo	nódulo	1	cara	-	+++	++	+++	A	A	A	*	A	clásico
14	06754	F	63	mestizo	nódulo	múltiple	cuello	-	++	+++	+++	A	A	-	*	A	clásico
15	04491	F	63	mestizo	nódulo	ND	pie	ND	++	+	++	-	A*	-	A*	A	clásico
16	04494	F	75	ND	nódulo	ND	pie	ND	++	+	++	A	A	-	-	A	clásico
17	06751	M	26	quechua	mácula	1	paladar	-	+++	+	++	C	C	-	*	C	clásico
18	04479	F	83	mestizo	pápula	1	pierna	-	+++	+	++	-	C	-	C	C	clásico
19	04482	M	75	mestizo	nódulo	múltiple	mano	-	+++	++	++	*	C	-	C	C	clásico
20	04487	F	70	quechua	nódulo	1	pie	-	+++	+	++	-	C	-	C	C	clásico
21	04488	M	75	mestizo	nódulo	múltiple	pie	-	+++	+	++	-	C	-	C	C	clásico
22	06733	M	58	mestizo	mácula	múltiple	paladar	-	-	+	+/-	-	C	-	-	C	clásico
23	06743	M	30	mestizo	nódulo	múltiple	cara	-	++	+	++	C	C	-	-	C	clásico
24	06745	M	31	mestizo	nódulo	múltiple	pierna	-	+	+	+	-	C	-	-	C	clásico
25	06767	F	76	quechua	nódulo	1	pierna	-	-	+++	-	-	C	C	C	C	clásico

LANA: Antígeno nuclear de latencia.

ND: No disponible.

Múltiple: 3 o más lesiones.

-: Sin producto de amplificación.

*: Señal débil en PCR.

Figura 1. Árbol Filogenético con Subtipos Peruanos del HVH-8.

