



Instituto de Medicina Tropical
"Pedro Kouri"
Departamento de Virología

**"Infección por Herpesvirus en individuos
cubanos seropositivos al VIH-1"**

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

Autor:

Dr. Pedro Ariel Martínez Rodríguez, MSc.

LA HABANA, 2012



Instituto de Medicina Tropical
"Pedro Kourí"
Departamento de Virología

**"Infección por Herpesvirus en individuos
cubanos seropositivos al VIH-1"**

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

Autor:

Dr. Pedro Ariel Martínez Rodríguez, MSc.

Tutores:

Dra. Vivian Kourí Cardellá, DrC.

Dra. Virginia Capó de Paz, DrC.

Asesor:

Prof. Susana Vázquez Ramudo, DrCs

LA HABANA, 2012



Dedicado:

Al Profesor Gustavo Kourí Flores

(1936-2011)



Agradecimientos:

A los pacientes que participaron en todos los estudios,

A mi abuela,

A mi hijo, mi madre y mi esposa,

A mis tutores y asesores,

A mis amigos,

A todos mis profesores,

A mis compañeros de trabajo,

A todos,

¡MUCHAS GRACIAS!



SÍNTESIS

Para evaluar el comportamiento de la infección por Herpesvirus (HVs) en algunas patologías que producen en individuos cubanos seropositivos al VIH-1 se estudiaron 241 pacientes con Síndrome Neurológico Infeccioso (SNI), 49 con Sarcoma de Kaposi (SK) epidémico (SK-SIDA), 22 contactos sin SK, 49 con Síndrome Adénico (SA) y 46 con enfermedades asociadas al HVH-8. Se empleó PCR anidada múltiple de HVs y PCR en tiempo real (qRT-PCR) de HVs linfotropos para amplificar su genoma en diferentes muestras clínicas. El subtipo del HVH-8 se determinó mediante secuenciación nucleotídica del gen K1. El 10.4 % del SNI fue de etiología herpesviral, los HVs más frecuentes fueron el CMVh (44 %), el VEB (28 %) y las coinfecciones (16 %). El 98 y el 72.7 % de los SK-SIDA y contactos, respectivamente, estaban infectados con el HVH-8, detectándose su ADN en diferentes fluidos y células. La CV del VEB >1000 copias en ganglio linfático (GL) se asoció con el linfoma de Hodgkin ($p=0.0295$) y el ADN del HVH-8 en GL con el SK ($p=0.0030$). No se encontró asociación entre CV y subtipos del HVH-8 en el tejido ($p>0.05$). Los resultados obtenidos resaltan la participación de los HVs en algunas patologías de pacientes cubanos VIH, tanto de evolución aguda como en procesos tumorales.



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

Acs: anticuerpos
ADN: ácido desoxirbonucleico
ADNg: ácido desoxirbonucleico genómico
ADNp: ácido desoxirbonucleico plasmídico
Ag: antígenos

C

CD: conjuntos de diferenciación específicos, del inglés *Cluster of differentiation*
CMSP: células mononucleares de sangre periférica
CMVh: Citomegalovirus humano
Cp: punto de corte, del inglés *crossing point*
CV: carga viral

D

DO: densidad óptica

E

EBERs: ARN codificados por el VEB, del inglés *Epstein-Barr virus-encoded RNA*
EBNA: Ag nuclear del Epstein Barr, del inglés *Epstein Barr nuclear antigen*
ELISAs: ensayos inmunoenzimáticos, del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMC: enfermedad multicéntrica de Castleman
EO: enfermedad oportunista
ES: exantema súbito
EUA: Estados Unidos de América

G

gp: glicoproteínas

H

HC: historia clínica
HLTV: hipertrofia linfoide y transformación vascular
HM: homosexuales
HSH: hombres que tienen sexo con hombres
HT: heterosexual
HVH-6: Herpesvirus humano-6
HVH-7: Herpesvirus humano 7
HVH-8: Herpesvirus humano 8
HVs: Herpesvirus

I

IB: Inmunoblástica
ICTV: Comité internacional de Taxonomía de virus, del inglés *International Committee on the Taxonomy of Viruses*
IE: inmediatas tempranas, del inglés *Immediate-early*
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IHQ: inmunohistoquímica
INOR: Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
IRIS: Síndrome Inflamatorio por Inmunoreconstitución, del inglés *Immune reconstitution inflammatory syndrome*
ITS: infecciones de transmisión sexual

J

JCV: virus JC, del inglés *JC virus*



L

LANA: Ags de fase latente del VEB, del inglés Latency-Associated Nuclear Antigen
late-EPCs: células progenitoras endoteliales de estadios tardíos, del inglés Late endothelial progenitor cells

LCR: líquido cefalorraquídeo

LEP: linfoma de efusión primario

LG: linfadenitis granulomatosa

LH: linfomas de Hodgkin

LMP: proteína latente de membrana, del inglés latent membrane protein

LNH: linfomas no Hodgkin

LR: linfadenitis reactiva

M

MGB: ligando del surco menor, del inglés Minor Groove Binder

MI: mononucleosis infecciosa

N

ndt: no detectable

NK: células asesinas naturales, del inglés natural killer

O

ORF: marco de lectura abierta, del inglés open reading frame

P

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés polymerase chain reaction

PrV: Virus de la Pseudorabia porcina, del inglés Porcine pseudorabies herpesvirus

Q

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, del inglés quantitative real time polymerase chain reaction

S

SDMM: Método de la Derivación Secundaria Máxima, del inglés Second Derivative Maximum Method

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SK: Sarcoma de Kaposi

SK-SIDA: Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA o epidémico

SNI: Síndrome Neurológico Infeccioso

T

TARVAE: terapia antirretroviral altamente efectiva

U

UV: ultravioleta

V

VCA: Ag de la cápside viral, del inglés viral capsid antigen

VEB: virus de Epstein Barr

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VHS: virus del herpes simple

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VVZ: virus de la varicela zoster

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Antecedentes	1
I.2. Objetivos	4
II. MARCO TEÓRICO	6
II.1. Distribución en la naturaleza	6
II.2. Propiedades biológicas	6
II.3. Nomenclatura y clasificación.....	6
II.3.1 <i>Alfaherpesvirinae</i>	7
II.3.1 <i>Betaherpesvirinae</i>	7
II.3.3 <i>Gammaherpesvirinae</i>	7
II.4. Estructura del virión.....	7
II.5. Latencia.....	9
II.6. Tropismo.....	9
II.7. Regulación de la expresión de genes en la replicación de los HVs.....	10
II.8. Epidemiología y transmisión.....	11
II.8.1. Transmisión madre-hijo del HVH-8.....	13
II.8.2. Transmisión sexual del HVH-8.....	14
II.8.3. Transmisión parenteral del HVH-8.....	15
II.8.4. Trasplante y HVH-8.....	15
II.9. Manifestaciones clínicas de la infección por HVs.....	16
II.10. Diagnóstico de la infección por HVs.....	17
II.10.1. Aislamiento viral.....	17
II.10.2. Diagnóstico molecular.....	18
II.10.3. Diagnóstico serológico.....	19
III. DISEÑO METODOLÓGICO	22
III.1. Diseño de los estudios.....	22
III.2. Consideraciones éticas generales.....	22
III.3. Recolección de la información.....	23
III.4. Infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI.....	23
III.4.1. Universo de estudio.....	23
III.4.1.1. Pacientes y muestras clínicas.....	23
III.4.2. Extracción de ADN.....	23
III.4.3. PCR anidada múltiple para detección de HVs.....	24
III.5. Infección por HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos.....	25
III.5.1. Universo de estudio.....	25
III.5.1.1. Pacientes y muestras clínicas.....	25
III.5.1.2. Procesamiento de las muestras clínicas para la cuantificación del HVH-8.....	26
III.5.1.2.1. Obtención de muestras de plasma y CMSP a partir de sangre total.....	26
III.5.1.2.2. Extracción del ADN de tejidos embebidos en parafina.....	27
III.5.1.2.3. Extracción del ADN a partir de muestras de tejido.....	27
III.5.1.2.4. Extracción del ADN a partir de muestras de plasma, CMSP y saliva.....	27
III.5.2. Normalización del qRT-PCR para cuantificar el ADN del HVH-8.....	27
III.5.2.1. Obtención del ADN estándar para construir la curva externa de calibración.....	27
III.5.2.1.1. Obtención de ADNg.....	28
III.5.2.1.2. Obtención de los productos de PCR del gen ORF-26.....	28
III.5.2.1.3. Obtención del ADN plasmídico (ADNp).....	28
III.5.2.2. Cuantificación de los ADN estándares por qRT-PCR.....	29
III.5.2.3. Confección de las curvas estándares.....	29
III.5.2.4. Selección de la curva externa estándar para cuantificar el ADN del HVH-8 en diferentes muestras clínicas.....	30
III.5.3. qRT-PCR para cuantificar el ADN del HVH-8 en muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y sus contactos.....	30
III.6. Infección por HVs linfotropos en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico.....	32

III.6.1. Universo de estudio.....	32
III.6.1.1. Pacientes y muestras clínicas.....	32
III.6.2. Marcadores virológicos de infección por HVs linfotropos.....	33
III.6.2.1. ELISA para la detección de Acs anti-CMVh, VEB y HVH-6.....	33
III.6.2.1. qRT-PCR de HVs linfotropos en ganglios linfáticos y saliva.....	34
III.7. Caracterización molecular del HVH-8 en pacientes con algunas enfermedades asociadas con este agente.....	35
III.7.1. Universo de estudio.....	35
III.7.1.1. Pacientes y muestras clínicas.....	35
III.7.2. Extracción de ADN de muestras clínicas.....	35
III.7.3. qRT-PCR para la cuantificación del HVH-8.....	35
III.7.4. PCR del fragmento del gen ORF-K1 del HVH-8 para secuenciación nucleotídica.....	36
III.7.5. Secuenciación nucleotídica.....	36
III.7.6. Análisis de las secuencias.....	37
III.8. Análisis estadístico.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
IV.1 Infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI.....	39
IV.1.1. Frecuencia de infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI tras la introducción de la TARVAE.....	39
IV.1.2. Relación de la infección por HVs en el SNC con el comportamiento clínico y epidemiológico del SNI de individuos seropositivos al VIH-1.....	43
IV.2. Infección por HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos.....	44
IV.2.1. Frecuencia de infección del HVH-8 y CV en diferentes muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y sus contactos.....	49
IV.2.1.1. Carga viral del HVH-8 en pacientes con SK-SIDA.....	51
IV.2.1.2. Carga viral del HVH-8 en contactos sin evidencias clínicas de SK.....	55
IV.2.2. Relación de la CV del HVH-8 en individuos con SK-SIDA y sus contactos, con las variables clínico, epidemiológicas e histopatológicas.....	57
IV.3. Infección por HVs linfotropos en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico.....	61
IV.3.1. Prevalencia de Acs contra VEB, CMV y HVH-6 en pacientes seropositivos al VIH-1 con diagnóstico de Síndrome Adénico.....	64
IV.3.2. CV de HVs linfotropos en el ganglio linfático y la saliva en el manejo del Síndrome Adénico de pacientes seropositivos al VIH-1.....	65
IV.3.3. Relación entre la CV de los HVs linfotropos con el comportamiento clínico, epidemiológico e histopatológico del Sínd. Adénico de individuos seropositivos al VIH-1.....	71
IV.4. Caracterización molecular del HVH-8 en pacientes con algunas enfermedades asociadas con este agente.....	79
IV.4.1. CV y los subtipos del HVH-8 en diferentes muestras clínicas de pacientes seropositivos al VIH-1 con enfermedades asociadas con este agente.....	79
IV.4.2. Relación entre la CV y el subtipo del HVH-8 con el comportamiento clínico, epidemiológico e histopatológico.....	82
IV.5 Consideraciones generales.....	88
V. CONCLUSIONES	94
VI. RECOMENDACIONES	96
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	123



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes

Hasta el momento, se han identificado ocho miembros de la familia *Herpesviridae* que infectan al humano, ellos son: Virus del Herpes simple 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2), Citomegalovirus humano (CMVh), Virus de la Varicela Zoster (VVZ), Virus del *Epstein Barr* (VEB), Herpesvirus humano 6 (HVH-6), 7 (HVH-7) y 8 (HVH-8) (1). Dentro de esta familia, a excepción del VHS y el VVZ el resto de los agentes son capaces de infectar a los linfocitos, por lo que se reconocen como Herpesvirus (HVs) linfotropos (2). Todos los HVs establecen una infección latente en el hospedero que infectan y su genoma retiene la capacidad de replicarse durante las reactivaciones. Se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial y pueden transmitirse a través de la saliva de individuos infectados, incluso en ausencia de síntomas clínicos (3-5). A pesar de que la infección primaria por estos agentes ocurre en los primeros años de vida de forma asintomática, son capaces de producir un amplio espectro de patologías en individuos inmunocomprometidos, específicamente en aquellos seropositivos al VIH-1 (1).

El pronóstico de vida de pacientes seropositivos al VIH-1 cambió a partir de 1996 cuando se introdujo la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE) en su manejo. Gracias a la TARVAE el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se ha convertido en una enfermedad crónica tratable. Con la terapia se logró disminuir el número de muertes relacionadas al SIDA (2.1 millones en 2004 a 1.8 millones en 2009) y la incidencia de las Enfermedades Oportunistas (EO), incluso con cambios en su curso clínico. En la era post-TARVAE, el tiempo de supervivencia de los pacientes se incrementa a 10 años o más de haber marcado SIDA por EO. Esta cifra contrasta con los dos años que sobrevivía el paciente tras el diagnóstico de la EO antes de 1996. El resultado de estos avances se traduce en el aumento del número de personas que actualmente viven con VIH a nivel mundial, en los que el SIDA aún representa una amenaza (6). En ellos, los HVs son patógenos oportunistas que se involucran en la progresión hacia la inmunodepresión y entre las enfermedades que producen se pueden citar: el Síndrome



Neurológico Infeccioso (SNI) y el Síndrome Adénico. Aún más, se reconoce el papel del VEB y del HVH-8 en la génesis de varios procesos tumorales asociados al SIDA (7).

La enfermedad neurológica constituye la primera manifestación del SIDA entre el 10% y 20% de la infección sintomática por VIH (8), entre sus causas se encuentra el SNI producido por HVs (9). Lamentablemente no se han identificado los parámetros clínicos, imagenológicos o del laboratorio clínico que permitan llegar al diagnóstico etiológico del SNI. Lo mismo sucede con el Síndrome Adénico que aparece en este grupo poblacional, en los que el médico de asistencia se ve obligado a indicar varios complementarios para llegar al diagnóstico etiológico. Se conoce que el listado de patologías que pueden producirlo es amplio (10) y en ocasiones puede seguir un curso benigno. No obstante, en otros pacientes, la causa del Síndrome es un proceso linfoproliferativo (11-14). Entonces, la conducta y el tratamiento serían completamente diferentes. Se estima que varios patógenos pueden producirlo (15, 16) pero aún no se ha determinado la frecuencia con que participan los HVs linfotropos.

Se plantea que entre el 15 y 20% de todas las neoplasias en humanos se asocian con una infección viral y entre los HVs se reconoce el potencial oncogénico del HVH-8 y del VEB (17). Se acepta que el HVH-8 es el agente causal de las cuatro variantes clínico-epidemiológicas del Sarcoma de Kaposi (SK) (clásico, endémico, iatrogénico y epidémico), del Linfoma de Efusión Primario (LEP) y de la Enfermedad Multicéntrica de Castleman (EMC) (18). Hasta el momento no se ha identificado categóricamente su modo de transmisión. No obstante, a pesar de que algunos autores plantean que éste posee un patrón de transmisión mayoritariamente sexual (19-21), las evidencias actuales resaltan el papel de la saliva y el contacto oral en su transmisión (22-24). Asimismo, se acepta la participación del VEB en la génesis de los linfomas de células B [linfomas no Hodgkin (LNH), linfomas de Hodgkin (LH), etc.] principalmente en pacientes seropositivos al VIH-1, cuya forma de presentación pudiera ser un Síndrome Adénico (25). En general, se plantea que la infección viral *per se* no es suficiente para el desarrollo del cáncer, lo que ha obligado a identificar los factores, desconocidos aún, que inciden en la oncogénesis que estos dos agentes inducen (26).

Debido al amplio espectro de patologías que producen los HVs en el individuo seropositivo al VIH adquiere mayor relevancia su identificación rápida, específica y certera. El diagnóstico virológico se ha favorecido con los avances alcanzados en la biología molecular. La reacción en cadena de la polimerasa a punto final (PCR siglas del inglés *polymerase chain reaction*) permite identificar fragmentos del genoma del agente infeccioso en menos de 24 hrs en diferentes muestras clínicas. Con ello se favorece el inicio de la terapéutica oportuna en pacientes afectados (27).



Hasta el momento se han diseñado protocolos de PCR sensibles y específicos que permiten detectar simultáneamente en un mismo tubo de reacción a varios agentes relacionados con Síndromes clínicos (28, 29). Estas herramientas constituyen actualmente la técnica de oro en el estudio del SNI y han reemplazado algunos métodos invasivos que con frecuencia ponían en peligro la vida del paciente (e.g biopsia cerebral) (30).

Mediante la determinación del número de copias de genoma viral a través de ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR siglas del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*) se favoreció el diagnóstico de la infección por HVs. Estos ensayos han facilitado la interpretación de los mecanismos patogénicos de su infección, así como el monitoreo de la respuesta terapéutica. Constituyen sistemas válidos para el diagnóstico de la infección activa, en especial, si se realiza en fluidos orgánicos y tejidos afectados (31). Por tanto, la carga viral (CV) es un marcador esencial en el estudio de la infección por HVs, que contrasta con el escaso significado clínico que tiene la detección de anticuerpos (Acs) específicos en la caracterización de la infección por patógenos latentes (32, 33). La interpretación de los marcadores serológicos en individuos seropositivos al VIH-1 es compleja debido a la disminución o supresión de la respuesta inmune humoral que induce la infección por el VIH (34).

Cuba exhibe la menor prevalencia de infección por VIH en el continente Americano (0.1%) y su epidemia se considera una de las menores del mundo (6). El tratamiento con antirretrovirales se introdujo en el año 2001 de forma gradual a partir de medicamentos genéricos de producción nacional (35). Con ello se favoreció la disminución de la mortalidad y el incremento en la expectativa de vida del paciente cubano seropositivo al VIH-1. Sin embargo, no se ha logrado reducir de forma significativa el número de diagnósticos de SK-SIDA, observándose incluso un discreto incremento en el diagnóstico de procesos linfoproliferativos [Datos del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK)].

El laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) del Departamento de Virología del IPK es el único centro en Cuba que se encarga del diagnóstico microbiológico de la infección por HVs. En dicho laboratorio también se desarrollan investigaciones sobre la participación de estos agentes en patologías asociadas a estados de inmunodepresión. Así se pudo identificar que el número de muestras de líquidos cefalorraquídeos (LCR) de pacientes seropositivos al VIH-1 con sospecha de SNI por HVs que se recibían en el Laboratorio de ITS del IPK no se redujo tras la introducción de la TARVAE en Cuba. Por otra parte, en estudios previos de Kourí y colaboradores se involucró la participación de varios subtipos del HVH-8 en la génesis del SK-SIDA, comprobándose que dicho agente es capaz de establecer una infección asintomática en



contactos sexuales de esos pacientes (36-38). Sin embargo, se desconoce si existe relación entre el subtipo viral y la CV del HVH-8 en el tejido; incluso si es posible que este agente sea capaz de producir una infección sistémica en el hospedero. Por otra parte, se reconoció que la frecuencia de participación de los HVs linfotropos en el Síndrome Adénico no se había determinado, como tampoco se conocía el rol del VEB en los procesos linfoproliferativos que se diagnostican en individuos cubanos seropositivos al VIH.

Teniendo en cuenta los datos enunciados anteriormente, surgieron diferentes preguntas científicas a las que se intentó dar respuesta. En este sentido se cuestionó: ¿cuál es el comportamiento clínico, epidemiológico y virológico del SNI de etiología herpesviral en pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 tras la introducción de la TARVAE en Cuba?; ¿cuál es la frecuencia de detección del HVH-8 y el valor de su CV en diferentes fluidos y células de pacientes con SK-SIDA y sus contactos?; ¿cuál es la utilidad de la CV de HVs linfotropos en ganglio linfático y saliva para el diagnóstico diferencial del Síndrome Adénico en individuos seropositivos al VIH-1?, y por último, ¿cuál es la asociación entre el subtipo del HVH-8 y su CV en el tejido con el desarrollo de las enfermedades que este agente induce en individuos seropositivos al VIH-1?. Las preguntas de investigación enunciadas llevaron al planteamiento de hipótesis científicas que se enumeran a continuación:

1. Los HVs constituyen una causa importante de SNI en pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 tras la introducción de la TARVAE en Cuba.
2. El HVH-8 produce una infección sistémica en diferentes fluidos y células a través de los que es capaz de transmitirse a un individuo susceptible.
3. La CV de HVs linfotropos en el ganglio linfático y saliva constituye un marcador de infección activa en individuos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico.
4. El subtipo y la CV del HVH-8 constituyen marcadores virales que influyen en el desarrollo de las enfermedades que este agente induce en individuos seropositivos al VIH-1.

I.2. Objetivos

Una vez elaboradas las hipótesis de investigación y con vistas a evaluar la veracidad de las mismas se planteó como objetivo general:

- Evaluar el comportamiento de la infección por HVs en algunas de las patologías que producen en individuos seropositivos al VIH-1 en la era post-TARVAE en Cuba.

Para dar cumplimiento a este objetivo, se llevaron a cabo cuatro investigaciones de corte transversal que se corresponden con las hipótesis planteadas. Es por ello que cada hipótesis



científica que se evalúa en el presente estudio constituye una tarea de investigación en las que se trazaron los siguientes objetivos específicos:

Infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI

1. Determinar la frecuencia de infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI.
2. Identificar la posible relación de la infección por HVs en el SNC con el comportamiento clínico y epidemiológico del SNI de individuos seropositivos al VIH-1.

Infección por HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos.

1. Determinar la frecuencia de infección del HVH-8 y CV en diferentes muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y sus contactos.
2. Identificar la posible relación de la CV del HVH8 en individuos con SK-SIDA y sus contactos, con las variables clínico, epidemiológicas e histopatológicas.

Infección por HVs linfotropos en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico

1. Determinar la prevalencia de Acs contra VEB, CMV y HVH-6 en pacientes seropositivos al VIH-1 con diagnóstico de Síndrome Adénico.
2. Determinar la CV de HVs linfotropos en el ganglio linfático y la saliva en el manejo del Síndrome Adénico de pacientes seropositivos al VIH-1.
3. Evaluar la relación entre la CV de los HVs linfotropos con el comportamiento clínico, epidemiológico e histopatológico del Síndrome Adénico de individuos seropositivos al VIH-1.

Caracterización molecular del HVH-8 en pacientes con algunas enfermedades asociadas con este agente

1. Determinar la CV y los subtipos del HVH-8 en diferentes muestras clínicas de pacientes seropositivos al VIH-1 con enfermedades asociadas con este agente.
2. Identificar la posible relación entre la CV y el subtipo del HVH-8 con el comportamiento clínico, epidemiológico e histopatológico.



II. MARCO TEÓRICO

II.1. Distribución en la naturaleza

Los HVs se encuentran ampliamente diseminados en la naturaleza. La mayoría de las especies animales poseen al menos uno o varios de estos agentes que los infectan. Su número sobrepasa los 170 agentes. Generalmente, son virus especie específicos que no se transmiten de forma natural a hospederos de otras especies. No obstante, se reconoce que la transmisión de HVs de otras especies al humano puede ocurrir de forma ocasional, en escenarios en los interactúa el hombre con animales (granjas, zoológicos, mascotas) (1).

II.2. Propiedades Biológicas

La mayoría de los HVs descubiertos hasta el momento comparten varias propiedades biológicas (39), entre ellas se pueden citar:

1. Requieren de un grupo de enzimas para el metabolismo de los ácidos nucleicos (e.g., timidina kinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa); la síntesis del ácido desoxirbonucleico (ADN) (e.g., ADN polimerasa, helicasa, primasa) y el procesamiento de las proteínas (e.g., Proteína kinasa). El número exacto de dichas enzimas puede variar entre los HVs.
2. La síntesis del ADN viral y el ensamblaje de la cápside del virión ocurren en el núcleo de la célula diana.
3. La liberación de partículas virales infecciosas conduce invariablemente a la destrucción de la célula infectada.
4. Todos los HVs son capaces de establecer una infección latente en sus hospederos naturales. Durante la latencia viral el genoma del virus se circulariza en el núcleo de las células infectadas y en ella sólo se expresa un número limitado de genes virales. Por el contrario, en la infección crónica sí se obtiene progenie infecciosa viral. Los mecanismos moleculares que conllevan a la reactivación del estado latente no se han dilucidado, pero pueden variar entre los HVs.

II.3. Nomenclatura y clasificación

Los integrantes de la familia *Herpesviridae* fueron clasificados inicialmente por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV siglas del inglés *International Committee on the*



Taxonomy of Viruses) en tres subfamilias, teniendo en cuenta las propiedades biológicas, las características de su replicación y tropismo. Así se reconocen las subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (40, 41). Esta clasificación se implementó mucho antes de que se conociera la secuencia nucleotídica del genoma de cada HVs. El ICTV ha propuesto que los HVs se designen con un número arábigo seriado que irá antecedido por la familia (en la mayoría de los casos) o la subfamilia (para primates y algunos animales) de su hospedero natural (e.g., Herpesvirus Humano 7, Herpesvirus félicos 1) (1).

II.3.1. *Alfaherpesvirinae*

Los miembros de esta subfamilia se agrupan en base al rango hospedero variable, el ciclo reproductivo relativamente corto, la rápida propagación en cultivo de células, la eficiente destrucción de las células infectadas y por su capacidad para establecer la infección latente en ganglios sensoriales (aunque no es el sitio exclusivo) (42). Contiene el género Simplexvirus (VHS-1) y Varicelovirus (VVZ).

II.3.2. *Betaherpesvirinae*

Una característica que no es exclusiva de los miembros de esta subfamilia es el rango hospedero restringido. El ciclo reproductivo de sus miembros tarda mucho y la infección progresa de manera lenta en el cultivo. Las células infectadas se agrandan (Citomegalia) y se establece la persistencia en el cultivo. Los HVs que la integran pueden mantenerse en estado latente en las glándulas secretorias, células linfocitares, riñones y otros tejidos (43). Esta subfamilia contiene los géneros Citomegalovirus (CMVh) y Roseolovirus (HVH-6 y HVH-7).

II.3.3. *Gammaherpesvirinae*

El rango hospedero experimental de los miembros de esta subfamilia se limita a la familia o al orden al que pertenece el hospedero natural. Todos sus miembros se replican *in vitro* en células linfoblastoides y algunos pueden causar infección lítica en algunos tipos de células epiteliales o fibroblásticas. Los virus en este grupo tienen tropismo específico por los linfocitos T ó B, por lo que su estado latente se puede demostrar en el tejido linfoide (44). Esta subfamilia contiene dos géneros: Linfocriptovirus y Radinivirus, cada género posee un miembro que infecta a humanos, el VEB y el HVH-8; respectivamente.

II.4. Estructura del virión

La morfología del virión fue uno de los criterios iniciales que se tuvo en cuenta para incluir a un agente en la familia *Herpesviridae*. Los viriones son esféricos y compuestos por cuatro componentes principales: el núcleo o *core*, la cápside, el tegumento y la envoltura. La envoltura lipídica rodea la cápside viral, por lo que se reconoce que son virus envueltos. Mediante



microscopía electrónica se demostró que dicha envoltura tiene una apariencia trilaminar (45) y deriva de pequeños parches de la membrana de la célula diana en la que se expresan las glicoproteínas (gp) virales (46-48). Dichas gp además de ser numerosas y pequeñas, protruyen en la superficie del virión y son de número variable (49). Los viriones poseen una talla que oscila entre 120 y 300nm (50) (Figura II.1).

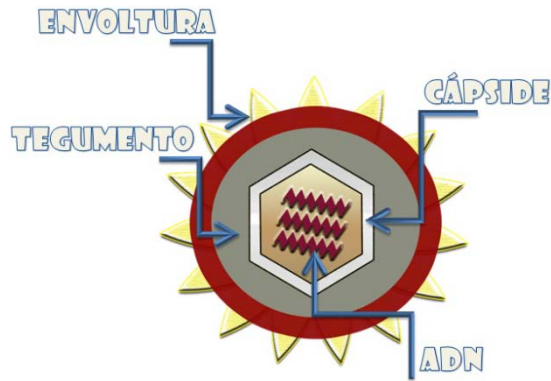


Figura II. 1. Representación esquemática de la estructura de los HVs

El tegumento se distribuye de forma asimétrica por debajo de la envoltura, rodeando la cápside viral. Su grosor puede variar en dependencia de la ubicación del virión en la célula infectada (51) y es el responsable de las variaciones en la talla de los integrantes de la familia. Su estructura ha sido pobremente definida, aunque se estima que contiene quizás treinta o más tipos de proteínas virales. La composición proteica del tegumento y de la envoltura varía ampliamente entre los integrantes de la familia (52).

Las características de la cápside son comunes a todos los HVs, posee una simetría icosaédrica y rodea al núcleo o *core* (53). La misma tiene un diámetro externo entre 125 y 130 nm. Está formada por 162 capsómeros, 12 de ellos son pentonas y 150 hexonas, cada una contiene cinco y seis copias, respectivamente, de las proteínas de la cápside (54). El *core* del virus envuelve el genoma viral en forma de carrete en un estado líquido cristalino (55). Con el objetivo de plegarse dentro de la cápside no contiene proteínas extremadamente básicas que le permitan neutralizar las cargas negativas del ADN viral. Sin embargo, lo protege de la acción de detergentes no iónicos y de la urea (56).

El genoma está compuesto por una doble cadena de ADN lineal, que se circulariza en cuanto se libera por la cápside viral dirigiéndose hacia el núcleo de la célula que infecta. Su talla varía entre 120 y 250 kilobases (kb) (57, 58). En él se han identificado algunos genes que bloquean los mecanismos de defensas del hospedero ante la infección, llegando incluso a favorecer el establecimiento de la latencia. Los genes involucrados en la replicación viral codifican proteínas



necesarias para la entrada del virus en el interior de la célula, la regulación de la expresión génica, el metabolismo nucleotídico, la síntesis del ADN viral y de proteínas estructurales y por último para el ensamblaje del virión. Los genes regulatorios se adaptan a los requerimientos específicos del tipo celular que el virus infecta *in vivo* (59).

II.5. Latencia

La latencia es una estrategia replicativa de algunos patógenos que les permite evadir la acción de la respuesta inmune del hospedero. Durante esta etapa del ciclo replicativo viral no se obtiene progenie infecciosa y sólo se expresan algunas proteínas relacionadas con la latencia. Todos los HVs que se han identificado hasta el momento establecen su infección latente en una población específica de células. En términos generales, los tipos celulares en los que los HVs realizan la latencia son: la neurona para los Alfa herpesvirus, el linaje monocitario para los Beta herpesvirus y los linfocitos para los Gamma herpesvirus (60). El mecanismo de la latencia difiere de un virus a otro. A pesar de que la latencia es la piedra angular de la biología de los HVs, no existe ni una estrategia general ni tampoco un componente genético común para establecer, mantener o finalizar esta etapa del ciclo de vida. El genoma latente del VHS, del VVZ y del VEB se mantiene de forma extra-cromosómica (61, 62), aunque también se han identificado algunas copias del genoma del VEB integrados al genoma celular (63, 64).

Mientras que algunos miembros de un género de HVs codifican varias proteínas que se expresan durante el estado latente (*e.g.* VEB), otros no requieren en lo absoluto de la expresión del genoma viral en este período (*e.g.* VHS) (60). Un punto de debate actual es hasta qué punto el genoma de estos agentes se mantiene quiescente o si existe cierto grado de expresión génica viral. Los datos que se han recopilado hasta el momento apuntan hacia la expresión de un número limitado de genes virales.

En las líneas celulares immortalizadas por el VEB se expresan hasta nueve genes virales y las proteínas que codifican se expresan en la superficie de las células infectadas o dentro de su núcleo. Sin embargo, *in vivo* sólo dos de estos genes se expresan en los linfocitos latentemente infectados. Durante esta etapa del ciclo de vida de los HVs, el análisis de la expresión génica sugiere que en la naturaleza estos genes son predominantemente regulatorios. Ellos entonces serían los responsables de mantener el virus en estado latente o por el contrario activar un ciclo lítico para iniciar la reactivación viral (65).

II.6. Tropismo

Se considera que los HVs son agentes que se han adaptado muy bien a sus hospederos, sólo producen síntomas severos en individuos muy jóvenes o inmunosuprimidos. La mayoría



establece una infección sistémica asociados a células, aunque en algunos de los miembros del género Simplexvirus su infección se limita al epitelio del sitio de inoculación y a las neuronas sensoriales que lo inervan. El rango de células y organismos hospederos que pueden infectar los HVs es variable, desde muy amplio (VHS) a otros más estrechos (VEB); depende de la disponibilidad de los receptores. Poco se conoce sobre los factores celulares específicos que hacen factible la replicación de estos agentes en sus hospederos (66).

II.7. Regulación de la expresión de genes en la replicación de los HVs

Los genes de los HVs pertenecen a varias clases de genes regulatorios, y mientras más se estudian, mucho más complejo parece ser el sistema que regula su expresión. Durante la infección productiva se plantea que la expresión génica actúa en forma de cascada regulatoria. Sus características básicas son comunes a todos los miembros de la familia (59). Hasta el momento se han agrupado en:

- Genes α inmediatos tempranos (IE siglas del inglés Immediate-early): que no requieren de la síntesis de proteínas virales para su expresión.
- Genes β tempranos (E siglas del inglés Early genes): su expresión es totalmente independiente de la síntesis del ADN.
- Genes γ tardíos (L sigla del inglés Late genes): se han identificado dos clases, los parcialmente tardíos γ -1 cuya expresión incrementa con el inicio de la síntesis del ADN y los verdaderamente tardíos γ -2 cuya expresión depende de la síntesis del ADN viral.

La replicación de los HVs es un proceso de múltiples pasos cuidadosamente regulado (67). Inmediatamente después de haberse producido la infección del hospedero, comienzan a transcribirse los genes IE. Las proteínas codificadas por estos genes regulan su propia síntesis y a su vez estimulan la replicación del segundo grupo de genes (β). En algunos HVs las proteínas del tegumento inducen la síntesis de los transcritos IE. Las proteínas IE apoyan la replicación del genoma viral; de ellas, la timidina quinasa viral y la ADN polimerasa son las que mejor se han caracterizado hasta el momento (1).

Todos los HVs poseen secuencias terminales repetitivas en los extremos del genoma que le permiten circularizarse como una señal para el inicio de su replicación. Las moléculas de ADN hijas se generan de forma continua a través de un mecanismo de círculo rodante que tiene lugar en las moléculas parentales (68). Las nuevas hebras de ADN se cortan en secuencias específicas de la región terminal y posteriormente, se empaquetan en las nucleocápsides producidas *de novo*. Los productos de los genes tardíos se expresan durante la replicación del



ADN viral. Dichos productos se incorporan o ayudan al ensamblaje de los viriones en el núcleo de la célula infectada. Las nuevas partículas salen de la célula hospedera e inmediatamente infectan las células susceptibles contiguas (54).

Los HVs son capaces de alterar el microambiente celular para adecuarlo a sus necesidades. Estas alteraciones incluyen la culminación o estimulación de la síntesis macromolecular del hospedero, con lo que se induce o inhibe la replicación del ADN celular o la immortalización de la célula (69). En sistemas experimentales se comprobó que los HVs tienen genes que pueden transformar a la célula diana durante su infección. Sin embargo, sólo algunos agentes inducen la transformación e immortalización *in vivo* como parte integrada de su ciclo de vida (70).

El microambiente en el que se replican los HVs es hostil inclusive para el mismo virus pues ellos pueden inhibir la respuesta tanto a nivel celular como la del organismo como un todo. Los HVs pueden bloquear la apoptosis celular y la vía del interferón (IFN). Mientras que a nivel de organismo la respuesta es variable y depende en parte de la célula diana (71). El rango de la respuesta varía desde el bloqueo de la presentación de antígenos (Ags) peptídicos en la superficie de las células presentadoras hasta el mimetismo molecular por el que algunas de las proteínas virales funcionan como inmunomoduladoras (72).

Una consecuencia común de este proceso es el retraso en la eliminación de la célula infectada, el tiempo suficiente como para que el virus se replique, colonice al hospedero y se transmita a otro individuo no inmune. El rango de genes que han evolucionado con este fin varía de un género a otro, incluso con una conservación limitada entre los miembros de una misma subfamilia (73). La diversidad de este tipo de estrategias testimonia la complejidad de los mecanismos de defensa del hospedero, así como de las acciones del virus para poder adaptarse. Los HVs permiten que la célula que infecta sobreviva por la necesidad de perpetuarse en la naturaleza, de lo contrario, si su hospedero muere él termina desapareciendo.

II.8. Epidemiología y transmisión

Como los HVs son virus envueltos no pueden sobrevivir en el ambiente por períodos prolongados (54). Por tanto, para que se puedan transmitir requieren ser inoculados directamente a partir de algún fluido orgánico o célula de una persona infectada en el tejido de otro hospedero susceptible (74, 75). Las posibles puertas de entrada de estos agentes incluyen: la mucosa de la cavidad oral, ocular, genital y anal, el tracto respiratorio, la vía hematogena y trasplacentaria (76). Los HVs no son capaces de penetrar de manera eficiente por el epitelio queratinizado. La forma más frecuente que tienen para transmitirse es mediante la excreción asintomática de partículas virales por individuos infectados. No obstante, también se pueden transmitir durante la infección primaria



o en el curso de una reactivación sintomática. En los individuos seropositivos al HVH-7 y al VEB se ha reportado que la frecuencia de excreción asintomática oscila entre el 15 y el 80%, respectivamente (77, 78).

Antes se pensaba que el VHS-1 y el VHS-2 se transmitían por rutas diferentes a través de varias zonas del cuerpo. Ahora se reconoce que existe solapamiento en la epidemiología de su infección y en las manifestaciones clínicas que producen. Se transmiten a través del contacto estrecho de un individuo susceptible con otro infectado que excreta el virus. No se ha identificado variación en la incidencia de su infección aunque la distribución geográfica, el estatus socioeconómico y la edad se reconocen como factores que influyen en su adquisición (79). En los países en vías de desarrollo, la seroconversión ocurre en etapas tempranas de la vida con diferencias en su frecuencia (80). Sin embargo, la infección primaria por el VVZ se inicia por la inhalación de partículas virales presentes en secreciones respiratorias o mediante el contacto con el fluido de vesículas de un individuo infectado (5, 81). La transmisión a través del aerosol de secreciones respiratorias se comprobó al detectar el ADN del VVZ en muestras del aire de habitaciones ocupadas por pacientes con varicela o herpes zoster diseminado (82).

Los estudios serológicos realizados en población adulta demostraron que la infección por Betaherpesvirus es ubicua. Sin embargo, los integrantes de esta subfamilia poseen patrones de transmisión horizontal diferentes con diseminación en la infancia temprana (HVH-6B y HVH-7) o durante la primera década de vida (CMVh) (83). Tras la adquisición del CMVh se puede excretar por medio de la orina, saliva, lágrimas, secreciones cervicales y semen durante meses o años (84). Esto guarda relación con la frecuencia con que se transmite en tales circunstancias en que se intercambien dichos fluidos. Así se identificó que el CMVh tiene dos patrones de transmisión: el horizontal y el vertical (85).

Durante la transmisión horizontal son dos las posibles fuentes de exposición al CMVh. La primera es la actividad sexual y la otra el contacto estrecho con niños pequeños. Aún más, su transmisión puede ocurrir a través de transfusiones o por trasplante de células, específicamente en trasplante de órganos de donantes seropositivos. Estas últimas vías de transmisión tienen mayor relevancia desde el punto de vista clínico que epidemiológico (86). En cuanto a la transmisión vertical, se acepta que el CMVh es el único HVs en el que se ha demostrado su transmisión natural a través de la placenta. Se piensa que este evento ocurre durante el primer trimestre de la gestación en pacientes seronegativas al CMVh, quizás por la ausencia de control de la respuesta inmune adaptativa. La diseminación al feto puede ocurrir por tres vías: transplacentaria, intraparto y mediante la lactancia materna (87).



El modo de transmisión del HVH-6 y 7 no se ha dilucidado aún, pero sí se conoce que son patógenos ubicuos cuya infección se produce en la infancia de forma horizontal. En general, se piensa que la fuente de infección sean los adultos que mantienen contacto estrecho con los infantes y que lo excretan de forma asintomática en la saliva (88). El ADN de ambos se ha detectado en la saliva de parejas de niños y madres, así como en la de individuos saludables. Con ello se refuerza su transmisión a través de la saliva (89). No obstante, el genoma del HVH-6A también se detectó en el tracto genital de mujeres embarazadas, por lo que éste podría transmitirse durante el parto transvaginal. Aún más, se ha propuesto la transmisión transplacentaria del HVH-6B (90); incluso otros autores han mostrado evidencias de la transmisión del HVH-6 y 7 a través del trasplante de órganos (91).

Por su parte, el VEB, se disemina a través de la vía oral. La mayor parte de los niños de países en vías en desarrollo se infectan mediante el contacto con familiares antes de los tres primeros años de vida. De forma general, la infección primaria suele cursar de forma asintomática (92). Aproximadamente el 50% de los individuos seropositivos al VIH-1 excretan el VEB en las secreciones orofaríngeas (93). Su transmisión entre adultos jóvenes se favorece por la transferencia de fluidos orales a través del beso, con el inicio de la actividad sexual. También, se han descrito casos de Mononucleosis Infecciosas (MI) después de transfusiones de sangre y de cirugía cardiovascular (94).

Las vías de transmisión del HVH-8 no se han dilucidado, este constituye un aspecto controversial que genera amplios debates. Algunos autores sugieren que su transmisión depende de la prevalencia de infección en diferentes áreas geográficas. En este sentido, se piensa que en las zonas endémicas (elevada prevalencia) el virus se transmite fundamentalmente por vía horizontal mediante rutas no sexuales, mientras que en las regiones de baja prevalencia predomina la transmisión sexual en determinados grupos de riesgo (95). Sin embargo, se ha demostrado que ambos modos de transmisión pudieran estar imbricados independientemente de la prevalencia reportada en una región específica, (96). Por tanto, proponemos un análisis independiente de cada una de las posibles vías de transmisión junto con la revisión de las hipótesis que mayor aceptación han tenido en la comunidad científica internacional en relación con la transmisión de este Radinivirus.

II.8.1. Transmisión madre-hijo del HVH-8

La prevalencia de infección del HVH-8 en población pediátrica de países endémicos es muy baja antes de los 2 años de edad (desaparición de Acs maternos), esta se incrementa tras superada esta edad (97). Se sugiere que el virus se transmite principalmente a través del contacto estrecho



con los miembros de la familia, en especial a través de las secreciones orales (98). Mediante estudios de epidemiología molecular se demostró que los familiares u otros contactos extrafamiliares fueron la fuente de infección del HVH-8 en niños de Malawi, África (99). Incluso se ha llegado a asociar determinados haplotipos presentes en mujeres africanas que favorecen la excreción del HVH-8 en la saliva. Estos son los haplotipos más frecuentes en ese continente y permitiría explicar la endemidad de este HVs en esa zona. Además, denotan la participación de la saliva en su transmisión (100).

El valor de la lactancia materna en la transmisión del HVH-8 también se ha evaluado, aunque con resultados contradictorios. Algunos autores no detectaron su ADN en la leche de madres seropositivas al HVH-8 en Zambia (101). Por el contrario, Dedicoat y colaboradores sí encontraron su ADN en la leche de mujeres africanas que tenían altos títulos de Acs anti-HVH-8. No obstante, el promedio de CV en la leche fue inferior al que se encontró en saliva. Fue por ello que estos autores recomendaron que deba considerarse a la lactancia materna como fuente potencial de infección del HVH-8, si se tiene en cuenta que el volumen de leche que ingiere el niño es mayor que el de la saliva (102).

La transmisión vertical también ha resultado ser un tema polémico. Algunos autores plantean que su participación en la propagación del HVH-8 es mínima, o que de suceder, constituye un evento poco usual. En Italia no se detectó el ADN del HVH-8 en el líquido amniótico de gestantes, ni en la sangre del cordón tomada al momento del parto (103). Sin embargo, otros autores mediante estudios de epidemiología molecular encontraron evidencias sobre la transmisión vertical del HVH-8 en Uganda (104). Inclusive, se reportó la infección primaria por el HVH-8 en un recién nacido producto de una madre seropositiva al VIH (105).

II.8.2. Transmisión sexual del HVH-8

Aunque los hallazgos que apoyan la importancia de la transmisión sexual en la infección por el HVH-8 se obtuvieron en estudios realizados en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) de países industrializados (106), otros aportaron evidencias de su transmisión entre heterosexuales (HT). En África, la infección por el HVH-8 entre individuos con diagnóstico de ITS y prostitutas se asoció con el bajo nivel educativo, el consumo de alcohol, la infección por *Neisseria gonorrhoeae* y la tenencia de múltiples parejas sexuales (20, 107). En Tanzania, se descubrió mayor riesgo de infección por HVH-8 en mujeres cuyos esposos estaban infectados por el virus (108). Mientras que en hombres HT de Kenya, su infección fue más común entre hombres no circuncidados y con historia previa de Sífilis, que en aquellos que refirieron usar condón (109).



Sin embargo, otros no encontraron ninguna relación entre la infección por HVH-8 entre cónyuges, inclusive niegan la posible transmisión del virus entre individuos HT (110, 111). De esta forma se ha sugerido que no es frecuente la transmisión del HVH-8 a través de las relaciones HT por la identificación esporádica y baja CV de su ADN en secreciones vaginales, semen y tejido prostático (112). La interpretación y comparación de todos estos hallazgos es difícil, ya que en algunos casos la asociación es muy débil e incluso contradictoria. Habría que agregar el uso de diferentes algoritmos y métodos diagnósticos en el manejo de la infección por el HVH-8, conociendo la gran variabilidad en la interpretación que existe entre los laboratorios.

II.8.3. Transmisión parenteral del HVH-8

Al igual que en los modos de transmisión expuestos anteriormente, los resultados publicados hasta el momento no son concluyentes. Existen evidencias de su transmisión mediante transfusiones de sangre (113-115). Moore y colaboradores propusieron que el pesquizaje de la infección por el HVH-8 en las transfusiones de sangre y en los trasplantes de órganos debe considerarse una prioridad para clínicos, bancos de sangre y agencias regulatorias. De esta forma resaltan la necesidad de encontrar un método diagnóstico aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (del inglés *Food and Drug Administration*) que favorecerá el control de la transmisión de este virus tumoral (116). Inicialmente, algunos autores al no encontrar el ADN del HVH-8 en la sangre de donantes de EUA justificaron la no introducción del pesquizaje de este HVs en los bancos de sangre (117). Sin embargo, otros autores documentaron la primera transmisión del HVH-8 mediante transfusiones en EUA (118). Entonces, esta es otra de las temáticas en las que no se ha dicho todo. En caso de dilucidarse su relevancia constituirá un arma importante para el control de su transmisión.

También se han aportado evidencias de la transmisión del HVH8 entre usuarios de drogas endovenosas mediante la exposición a sangre infectada (119). No obstante, se estima que el riesgo es menor que al del Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis C (VHC), y el VIH (120). Otros autores no han encontrado tal asociación (121). Henke-Gendo y Schulz plantearon que el virus puede transmitirse por medio del comportamiento que acompaña al uso de la droga, más que al consumo mismo (106).

II.8.4. Trasplante y HVH-8

Antes del descubrimiento del HVH-8 se conocía que la incidencia del SK era 500 veces más frecuente en receptores de trasplante en comparación con población inmunocompetente. En especial, en áreas en las que la prevalencia de infección por el HVH-8 es alta (122). No obstante, se estima que su incidencia puede ser hasta 1000 veces mayor en este grupo poblacional (123).



Más del 50 % de los receptores de trasplante que están infectados por el HVH-8 desarrollan el tumor bajo ciertas circunstancias. Esto hizo pensar que la mayoría de los casos de SK postrasplante eran resultado de la reactivación viral (124). Sin embargo, estudios recientes sugirieron que la transmisión del HVH-8 puede ocurrir a partir del órgano donado (125). Hasta el momento estos son los dos mecanismos que se han asociado con el desarrollo del SK iatrogénico. Por ello algunos autores resaltaron la importancia del pesquisaje de la infección por HVH-8 antes del trasplante tanto en el donante del órgano como en el receptor, aunque faltaría por analizar la relación costo/beneficio (123).

II.9. Manifestaciones clínicas de la infección por HVs

De forma general, la infección primaria por los HVs en el individuo inmunocompetente suele producirse en ausencia de síntomas clínicos. Sin embargo, en determinados grupos de riesgo son capaces de producir un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden fluctuar en su severidad desde cuadros febriles de evolución benigna hasta formas diseminadas que conducen a la muerte del paciente. En el anexo 2 se muestran las patologías más frecuentes que los HVs son capaces de causar en el humano (50, 65, 85, 126-128).

Algunos virus causan síndromes neurológicos muy característicos que permiten un correcto diagnóstico sobre la base de los datos clínicos, como la poliomielitis aguda o la rabia (129). Sin embargo, los HVs pueden causar un SNI menos específico que no permite sospechar la participación específica de alguno de ellos. El grado de deterioro del SNC así como la severidad de la infección dependerán de las características del agente etiológico (virulencia, neurotropismo) y del estado inmune del hospedero (130). Un interrogatorio preciso y el examen físico detallado, constituyen la piedra angular del correcto enfoque ante un paciente con SNI. Los datos obtenidos tras la realización de los mismos serán la principal guía para la correcta utilización de las técnicas complementarias, que permitirán llegar al diagnóstico etiológico de la infección (131).

El aumento de volumen de los ganglios linfáticos (localizados o generalizados) generalmente se acompaña de un grupo de síntomas y signos que conforman el Síndrome Adénico. Se denomina adenopatía a la enfermedad del ganglio linfático y al aumento de volumen del ganglio se reconoce en la terminología médica como adenomegalia. El aumento de volumen de los ganglios linfáticos puede producirse por un aumento tanto del número, como del tamaño de los folículos linfáticos por la proliferación de sus elementos celulares o por infiltración de células ajenas al ganglio. Esta infiltración puede estar ocasionada por metástasis de un carcinoma, una leucemia, o producida por los polimorfonucleares, como se observa en los procesos inflamatorios agudos (adenitis) (132). Las principales patologías que pueden producir este síndrome se muestran en el anexo 3.



II.10. Diagnóstico de la infección por HVs

El diagnóstico diferencial de los Síndromes que los HVs producen en individuos seropositivos al VIH-1 es complejo. De lo que deriva la importancia de la conducta a seguir ante un paciente en el que habrá que definir las herramientas diagnósticas a emplear. El diagnóstico molecular por medio de PCR en el LCR constituye la "técnica de oro" para el diagnóstico de la infección por HVs en el sistema nervioso (133). La biopsia exéretica de una de las adenopatías aumentadas de volumen o de una lesión en cualquier tejido es el método de elección cuando se sospecha un proceso maligno o cuando no se cuenta con todas las evidencias para arribar al diagnóstico. En el caso del ganglio linfático, esto permite evaluar desde la arquitectura del ganglio linfático, su histología, la presencia de Ags (Inmunohistoquímica) hasta estudios moleculares y citogenéticos (10). En el caso de la muestra del tejido favorece el análisis histopatológico que orienta el diagnóstico. Aunque desde el punto de vista clínico muchas de las patologías que producen los HVs pueden sugerir la participación de estos agentes, se requiere de herramientas de diagnóstico virológico para poder llegar a identificar su participación.

II.10.1. Aislamiento viral

El aislamiento de CMV se logra satisfactoriamente mediante la inoculación de la muestra clínica en líneas celulares de fibroblastos humanos, en las que produce focos de efecto citopático (ECP) de lenta aparición que se caracterizan por citomegalia celular. Este procedimiento es muy laborioso y después de la inoculación el ECP generalmente tarda dos semanas o más en aparecer. Aunque el aislamiento viral es menos sensible que las herramientas del diagnóstico molecular, se puede realizar otro método de diagnóstico rápido para detectar los Ag inmediatos tempranos del CMV en monocapas de fibroblastos humanos de 24 a 72 hrs de inoculadas. Este procedimiento incluye un paso de centrifugación con el que se favorece la adsorción y entrada viral, acelerándose la replicación viral y por tanto la expresión de proteínas inmediatas tempranas que se reconocerán por los Acs Monoclonales específicos (134, 135).

El aislamiento de HVH6 y 7 no se utiliza con fines diagnósticos, sólo en la investigación. Este constituye un procedimiento laborioso que requiere de una infraestructura de laboratorio y de personal altamente calificado. El HVH-6 se puede aislar a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) colectadas durante la fase aguda del Exantema Súbito (ES). Para ello es necesaria la activación linfocitaria con PHA o Acs anti CD3 y mantenimiento con IL-2 (136). El ECP aparece entre 7 a 10 días y poco tiempo después se produce la degeneración lítica de la célula. En ocasiones, el HVH-7 se puede aislar de la sangre periférica de pacientes con ES si se



sigue la metodología descrita anteriormente para el aislamiento del HVH-6. No obstante, también se ha logrado aislar de muestras de saliva (128).

Los primeros intentos que se llevaron a cabo para lograr la propagación del HVH-8 *in vitro* fueron insatisfactorios. Tras realizar el cocultivo de la línea celular BC-1 (latentemente infectada con el HVH-8) con otras líneas celulares [células Raji (línea de células B VEB positivas), BJAB (línea de células sin genoma del VEB), MoLT-3 (línea de células T maduras CD4⁺), líneas celulares de riñón de mono búho, células mononucleares de cordón umbilical humano] no se producía la infección activa y después de varios pases el genoma viral dejaba de detectarse (137). Por otra parte, aunque con una transmisión muy limitada, se logró propagar el HVH-8 en células 293 de riñón embrionario a partir de lesiones de Sarcoma de Kaposi (SK), pero el ADN viral sólo se pudo detectar mediante PCR. Por lo tanto, el aislamiento viral del HVH-8 no constituye una herramienta útil para el diagnóstico de la infección por este agente (138). No obstante, existen algunos reportes más recientes de autores que lograron su aislamiento a partir de muestras de saliva de pacientes infectados (139) así como a partir de células progenitoras endoteliales tardías (late-EPCs siglas del inglés *Late endothelial progenitor cells*) de pacientes con SK clásico (140).

El rango hospedero *in vitro* para lograr la infección eficiente del VEB se encuentra restringido a los linfocitos B humanos, obtenidos de sangre periférica (141), de las amígdalas o de sangre de cordón fetal (142, 143). Una vez que el VEB infecta primariamente a los linfocitos humanos no se produce replicación viral, pero induce una transformación de las células infectadas a linfoblastos capaces de proliferar en líneas celulares linfoblastoides de larga evolución. Esta observación constituyó un paso crítico para reconocer el poder oncogénico del VEB a través de la inmortalización de la célula latentemente infectada. Aunque en menor grado, se comprobó que el VEB también es capaz de establecer latencia en los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK siglas del inglés *natural killer*). También se han obtenido varias líneas celulares de origen epitelial en las que se logra aislar el VEB con eficiencia similar a la que se consigue en líneas derivadas de células B, entre ellas se pueden citar: HEK 293 (línea celular de carcinoma gástrico), líneas celulares de vesícula, laringe, hígado, colon y carcinoma de vejiga (144). El VEB se puede aislar a partir de la saliva o mediante el cocultivo de los linfocitos B de individuos infectados. No obstante, el aislamiento del VEB sólo se realiza con fines investigativos, no como herramienta diagnóstica en el manejo clínico de los pacientes (93).

II.10.2. Diagnóstico Molecular

Comúnmente se utiliza el PCR para detectar fragmentos del genoma de estos agentes. Hasta el momento se han publicado numerosos juegos de cebadores para la detección cualitativa y



cuantitativa del ADN viral en diferentes muestras clínicas. Gracias a estas herramientas se ha podido llegar a conocer desde las variantes virales de un mismo agente hasta la detección simultánea en un mismo tubo de reacción de varios HVs (145, 146). Aún más, con vistas a identificar la replicación activa del HVH-6 se ha llegado a combinar la reverso transcripción de ARNm viral con posterior amplificación secundaria, descartándose la amplificación del genoma viral latente (147).

El qRT-PCR se basa en el método que desarrolló Kary Mullis a partir del cual se logra amplificar selectivamente fragmentos específicos de ADN de forma logarítmica (148-150). En esta técnica los procesos de amplificación y detección se producen de forma simultánea, sin necesidad de alguna acción posterior. Además, la detección por fluorescencia permite determinar la cantidad de ADN sintetizado en cada momento de la amplificación, pues la fluorescencia que se emite durante la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (151).

II.10.3. Diagnóstico serológico

Varias casas comerciales han diseñado diferentes ensayos inmunoenzimáticos que permiten abordar el diagnóstico de la infección por todos los HVs (152-154), entre ellos se encuentran: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), los ELISAs (siglas del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*), ensayos de neutralización, radioinmunoprecipitación e *Immunoblot*. Algunos de ellos permiten detectar Acs IgM e IgG con lo que se favorece la clasificación de la infección. En correspondencia con estos marcadores serológicos, en algunas ocasiones se puede clasificar el tipo de infección por HVs que presenta el paciente, si es una infección primaria, latencia, reactivación o recurrencia viral (155).

La infección primaria por HVs se produce cuando el hospedero se expone por primera vez al agente, o sea el individuo es seronegativo al HVs. Generalmente transcurre de forma asintomática. Los hallazgos serológicos en este caso se corresponderían con la detección de Acs IgM en el suero colectado en la fase aguda de la enfermedad, pero en ausencia de Acs IgG. En caso de conocerse el *estatus* serológico anterior del paciente podría determinarse además una seroconversión de Acs contra el agente específico (156).

La latencia viral constituye una estrategia de replicación común de todos los HVs. En ella sólo se expresan algunas proteínas asociadas a la latencia sin que exista replicación viral activa (no progenie infecciosa). Siempre se establece después de una infección primaria con o sin síntomas de enfermedad. En este caso no se detectan Acs IgM en el suero y sólo existen Acs IgG que indican exposición previa al virus (157).



La recurrencia o reactivación viral no es más que el inicio de un período de replicación viral que se establece en un individuo previamente infectado con alguno de los HVs. En estos casos la detección tanto de Acs IgM o IgG caracterizará esta forma de infección, que puede o no, acompañarse de síntomas. Mediante otros métodos diagnósticos (aislamiento viral, detección de Ags o PCR) se puede detectar el virus o algunos de sus componentes en algún fluido orgánico (158). Cuando se detecta el agente en ausencia de síntomas clínicos o signos de enfermedad se denomina excreción asintomática o reactivación subclínica.

En la evaluación de los receptores de órganos antes del trasplante es importante determinar el *estatus* serológico para cualquiera de los HVs, tanto del paciente como del donante del órgano o de la transfusión de sangre (159). En algunas situaciones, la determinación del título de Acs anti CMV carece de especificidad por posibles falsos positivos o debido a la persistencia de Acs IgM por infección pasada. En estos casos la determinación Acs IgG anti CMV de baja avidéz permite identificar si la infección por el agente es reciente, ya que la avidéz de estos Acs se incrementa en el tiempo (87, 160). Además hay que señalar que en el paciente inmunocomprometido los métodos serológicos no son útiles en el diagnóstico de la enfermedad por CMV. Lo mismo sucede en el diagnóstico de la infección congénita por CMV; aunque se emplea la detección de IgM anti-CMV en el suero del recién nacido se prefiere la detección del virus en orina, suero o LCR ya sea por aislamiento o PCR (161, 162).

En los tumores asociados a la infección por el VEB algunos autores han encontrado títulos elevados de Acs anti EA e IgG VCA con bajos títulos de Acs EBNA (163). Los resultados deben interpretarse con cautela pues este patrón también aparece en el curso de enfermedades autoinmunes y otras entidades. La serología tampoco es un método confiable en aquellos pacientes en los que existe una inmunodeficiencia (SIDA, receptores de trasplante, etc.) (164).

BCP-1, KS-1, BC-3 y BCBL-1 son varias líneas celulares de LEP que se emplean para detectar Acs contra los Ags de fase latente (LANA siglas del inglés *Latency-Associated Nuclear Antigen*) y de fase lítica del HVH-8 (165-167). Aún se considera a la IFI como el método estándar para el diagnóstico serológico de la infección por el HVH-8, a pesar de ser menos sensible que otros ensayos serológicos (80% de sensibilidad) debido al bajo porcentaje de falsos positivos y a su elevada especificidad (127). En adultos sanos se conoce que la respuesta de Acs anti LANA y contra otros Ags del HVH-8 persiste por tiempo indefinido. Sin embargo, se ha planteado que en pacientes con SK en estadio final del SIDA (10-30%) se produce una pérdida de dichos Acs (165). Las evidencias actuales sugieren que existe una respuesta serológica heterogénea a los Ags del HVH-8 en diferentes poblaciones, por lo que se ha sugerido combinar varios Ags en los



ensayos serológicos para así lograr mayor porcentaje de detección (166, 168, 169). No obstante, es válido señalar que la serología del HVH-8 no proporciona información útil desde el punto de vista clínico en pacientes con SK, especialmente para el manejo terapéutico de los enfermos. Esta técnica no permite distinguir entre una infección activa o latente (170).



III. DISEÑO METODOLÓGICO

III.1. Diseño de los estudios

Con vistas a dar respuesta a las preguntas de investigación y así comprobar la veracidad de las hipótesis se llevaron a cabo cuatro estudios de corte transversal en:

1. Individuos seropositivos al VIH-1 con SNI durante el período 2001-2005.
2. Individuos seropositivos al VIH-1 con diagnóstico histopatológico de SK-SIDA y sus contactos durante el período 2004-2007.
3. Individuos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico durante el período 2009-2010.
4. Individuos seropositivos al VIH-1 con enfermedades asociadas a la infección con el HVH-8 durante el período 2004-2011.

III.2. Consideraciones éticas generales

En cada uno de los estudios se tuvo en cuenta las normas éticas y científicas para realizar estudios biomédicos en humanos establecidas en la Declaración de Helsinki. Se cumplió estrictamente con los principios básicos de autonomía, beneficencia y justicia. Se conservó el principio de confidencialidad del paciente y en el caso de los estudios que formaron parte de proyectos de investigación se respetó el principio de voluntariedad y el derecho individual de abandonar el estudio si así lo deseó. Se garantizó que ello no repercutiera en el tratamiento posterior de los mismos. Todos los resultados derivados de las investigaciones realizadas fueron informados por los médicos de asistencia a los pacientes.

En el estudio del SNI se emplearon los registros de entradas de muestras del laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK desde el año 2001 hasta el 2005. Los estudios realizados en pacientes con Síndrome Adénico y en aquellos con enfermedades asociadas a la infección por el HVH-8 y sus contactos formaron parte de proyectos ramales de investigación:

1. **Proyecto Ramal:** Virus del Herpes Humano 8 y Sarcoma de Kaposi en Cuba. Caracterización Viroológica, Clínico-Epidemiológica e histológica.
2. **Proyecto Ramal:** Papel de la infección por Herpesvirus en la producción del Síndrome Adénico en individuos cubanos.



Estas investigaciones fueron evaluadas y su ejecución aprobada por la comisión científica especializada y el comité de ética del IPK. En el caso del estudio de los pacientes con Síndrome Adénico también se evaluó por la comisión científica y el comité de ética del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR).

Los posibles candidatos a participar en cada una de las investigaciones recibieron, por parte de un personal calificado, toda la explicación sobre las características de la investigación con lenguaje claro y sencillo. Aquellos pacientes que accedieron a participar en los protocolos de investigación demostraron su aprobación mediante la firma de documentos de consentimiento informado diseñados para estos fines (Anexo 4).

III.3. Recolección de la información

Los datos personales, clínicos y resultados de las pruebas del laboratorio se obtuvieron por dos vías. La primera, en el momento de la entrevista por parte del médico de asistencia y la otra mediante la revisión de las historias clínicas individuales en el Departamento de Admisión y estadística del IPK. Los datos se recopilaron en modelos diseñados para la recolección de la información (Anexos 5-8). Posteriormente, se confeccionaron bases de datos protegidas por contraseñas mediante diferentes programas a los que sólo tuvo acceso el responsable de la investigación.

III.4. Infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI

III.4.1. Universo de estudio

III.4.1.1. Pacientes y muestras clínicas colectadas

En el presente estudio se incluyeron todas las muestras clínicas de LCR de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 que presentaron síntomas y signos de afecciones del SNC durante el período 2001-2005, de acuerdo con criterios publicados previamente (171). En todos ellos el diagnóstico clínico inicial fue el de una infección por HVs, aunque se indicaron varios estudios para realizar el diagnóstico nosológico diferencial con otros agentes infecciosos. Los datos clínicos de los pacientes en los que se demostró la infección por alguno de los HVs se obtuvieron mediante revisión retrospectiva de historias clínicas (HC) individuales en el Departamento de Admisión y Estadística del IPK. Finalmente, se recibieron 241 muestras de LCR obtenidas en condiciones estériles que se almacenaron a -70°C hasta que se procediera a extraer el ADN.

III.4.2. Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se emplearon $39.5\ \mu\text{L}$ de LCR que fueron sometidos a digestión con proteinasa K según el protocolo publicado por Tenorio y colaboradores (172). Para el primer ciclo de amplificación de PCR anidada múltiple se utilizaron cinco microlitros del ADN extraído.



III.4.3. PCR anidada múltiple para detección de HVs

Diferentes regiones del gen de la ADN polimerasa de los HVs se utilizaron para la amplificación específica mediante los cebadores reportados por Tenorio y colaboradores (172). Este protocolo anidado múltiple permite identificar en el mismo tubo de reacción el genoma de: VHS-1 y 2, VVZ, CMVh, HVH-6 y VEB. Durante la primera reacción se empleó una mezcla de cebadores no degenerados que amplifican 194 pb de una región consenso del extremo 3' del gen de la ADN polimerasa de los HVs. Dos microlitros del producto amplificado durante la primera reacción se sometieron a una segunda ronda de amplificación para lo que se utilizó otra mezcla de cebadores compuesta por cebadores homólogos 3' que hibridan con otra región consenso (sentido negativo 2) y cebadores no homólogos tipo-específicos (sentido positivo 2).

Tanto en la primera como en la segunda reacción de PCR la mezcla estuvo formada por 10 mM de tampón de PCR; 25 mM de cloruro de magnesio ($MgCl_2$); 25 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado; 5 pmol de cada cebador y 2 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen, EUA). Todas las mezclas fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación en el orden siguiente: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación de los cebadores a 53 °C (primera reacción) y 47 °C (segunda reacción) durante 1 min y la extensión a 72 °C durante 1 min. Para finalizar la elongación del ADN se incluyó un paso de 72 °C durante 4 min.

Para identificar la talla de los productos amplificados de cada uno de los HVs (VHS=120 pb, VVZ=98 pb, CMVh=78 pb, HVH-6=66 pb, VEB=54 pb) se aplicaron 10 μ L del producto de la segunda reacción en gel de agarosa al 4 % en TBE 1x (Tris-borato 40 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL). Los mismos se visualizaron en transiluminador de luz ultravioleta (UV) al terminar la corrida. Como control interno de la reacción se amplificó un fragmento de 140 pb de un plásmido de virus no humano (Virus de la Pseudorabia porcina, PrV siglas del inglés *Porcine pseudorabies herpesvirus*) donado gentilmente por el Dr. Tenorio del Instituto Carlos III de Madrid, España. Su uso permitió descartar la presencia de inhibidores durante la amplificación.

Los riesgos de contaminación se eliminaron al separar las áreas de trabajo entre las dos reacciones, incluso en la preparación de las mezclas de PCR. Se trabajó con diferentes pipetas y puntas con barrera (libres de ARNasa-ADNasa) para cada una de las reacciones. Se utilizaron cinco microlitros de agua libre de ARNasa-ADNasa como control negativo de la reacción y se incluyeron controles positivos del VHS, CMVh y VEB.



III.5. Infección por HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos

III.5.1. Universo de estudio

III.5.1.1. Pacientes y muestras clínicas colectadas

En el presente estudio accedieron a participar 71 individuos que se agruparon en las siguientes categorías:

Pacientes con SK-SIDA: 49 pacientes seropositivos al VIH-1 con diagnóstico histopatológico de SK-SIDA diagnosticados en el período 2004-2007.

Contactos de pacientes con SK-SIDA: 22 individuos contactos de pacientes con SK-SIDA, a los que se les realizó examen físico sin encontrarse evidencias clínicas de la enfermedad. Dentro de este grupo se clasificaron como:

Contacto sexual: individuo que al interrogatorio refirió mantener relaciones sexuales por más de dos años con un paciente con SK-SIDA (19 individuos).

Pareja serodiscordante: contacto sexual de paciente con SK-SIDA que no se ha infectado con el VIH a pesar de mantener relaciones sexuales con él (tres individuos).

Contacto intradomiciliario: individuo que al interrogatorio refirió convivir por más de dos años en el mismo hogar de un paciente con SK-SIDA (tres individuos seronegativos al VIH-1, una hermana y dos madres de los pacientes).

En el caso de los pacientes con SK-SIDA se solicitó muestras de: sangre total, saliva y tejido; mientras que a los contactos asintomáticos sólo se les solicitó sangre total y una muestra de saliva (Tabla III.1). Los 20 mL de sangre venosa periférica que se extrajeron a cada participante se dispensaron en tubos plásticos estériles de 50 mL que contenían 2 mL de Citrato de Sodio. La saliva se colectó mediante emisión espontánea en tubos estériles de 1.5 mL. La recolección de ambas muestras se llevó a cabo por personal calificado del Departamento de Laboratorio Clínico del IPK. Todas las muestras se transportaron en condiciones de refrigeración al Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK cumpliendo estrictamente con la normas de bioseguridad. Las muestras de saliva se almacenaron a -20°C , pero la extracción de CMSP y plasma se realizó de manera inmediata a partir de la muestra de sangre total. Un fragmento del tejido de la lesión se colectó en los pacientes con sospecha clínica de SK-SIDA en el momento de la biopsia diagnóstica, este se envió al Laboratorio de ITS en frasco estéril. En aquellos en los que se diagnosticó el SK-SIDA antes de iniciar el presente estudio se solicitó al Departamento de Anatomía Patológica un fragmento del bloque de parafina.



Tabla III.1. Muestras clínicas colectadas de pacientes con SK-SIDA y contactos asintomáticos.

Muestras Clínicas	SK-SIDA	Contactos	Total
Plasma	27	22	49
Saliva	41	22	63
Tejido	48	-	48
CMSP	26	22	48
Total	142	66	208

De acuerdo con las características macroscópicas de las lesiones (173), éstas se definieron como:

SK cutáneo: lesiones en forma de máculas, pápulas o nódulos, de forma variable, solitarios o con tendencia a formar placas, de color rosado o hasta violáceo, distribuidas a lo largo de líneas de tensión de la piel, indoloras y no pruriginosas.

SK mucocutáneo: lesiones similares a las cutáneas pero se localizan en las mucosas (e.g. paladar duro, conjuntiva o genitales externos (hombre: prepucio o glande)).

SK sistémico o visceral: Cuando se identificó mediante procedimientos diagnósticos específicos la invasión del SK a órganos internos (pulmones, estómago, intestino, bazo, hígado, corazón, etc).

Las lesiones del SK-SIDA se clasificaron teniendo en cuenta las características histológicas descritas en el informe de biopsia de cada paciente, según los estadios publicados por Calonje y Wilson en 1999 (173). Sin embargo, en aquellos pacientes cuyo informe de biopsia el patólogo no hizo referencia a ningún estadio se consideraron como no clasificados.

Como debut clínico de SIDA se consideró a los individuos con antecedentes de salud previa que presentaran una condición clínica definitoria de SIDA [conteo de linfocitos T CD4+ inferior a las 200 células/mL o enfermedad marcadora del SIDA (e.g.: SK-SIDA)] al diagnóstico de la infección por el VIH, según criterios publicados previamente (174).

III.5.1.2. Procesamiento de las muestras clínicas para la cuantificación del HVH-8

III.5.1.2.1. Obtención de muestras de plasma y CMSP a partir de sangre total

Los 20 mL de la sangre venosa periférica se dispensaron lentamente por las paredes de un tubo de 50 mL estéril que contenía cinco mililitros de *Ficoll-hypaque* (SIGMA, EUA) protegiéndose de la luz. Después, los tubos se centrifugaron a 3 000 xg durante 30 min a 37 °C. Inmediatamente, se extrajo todo el anillo de CMSP y tres mililitros de plasma de cada paciente. Las CMSP se dispensaron en tubo de 15 mL estéril y se sometieron a dos lavados con medio RPMI frío (GIBCO, EUA) que se eliminó mediante centrifugación a 2 000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se realizó conteo de CMSP en cámara de *Newbauer* con el fin de someter al proceso de extracción de ADN a sólo 1×10^6 células que se resuspendieron en 200 μ L de RPMI y se almacenaron a -20 °C.



III.5.1.2.2. Extracción del ADN de tejidos embebidos en parafina

Se emplearon ocho cortes de 5-10 μm de grosor de tejidos con lesiones de SK-SIDA previamente embebidos en parafina que se dispensaron en tubos estériles de 1.5 mL. La parafina fue eliminada de los cortes de tejido mediante el uso de Xilol según protocolo publicado previamente (175). Una vez eliminada la parafina se rehidrató el tejido con lavados sucesivos de etanol al 100 y al 75 % en agua destilada. Luego se centrifugó a 10 000 xg durante 15 minutos a 4 °C para eliminar el etanol. El tejido sedimentado se sometió a extracción de ADN mediante la metodología del siguiente acápite.

III.5.1.2.3. Extracción del ADN a partir de muestras de tejido

El tejido desparafinado, 25 mg de tejido fresco congelado y 10 μL de H_2O bidestilada (control negativo) se sometieron al protocolo para extracción de ADN en muestras de tejido del estuche comercial *QIAamp[®] DNA Mini Kit* (QIAGEN, Alemania), según las indicaciones del fabricante. La concentración del ADN purificado para cada muestra se calculó tras lectura en espectrofotómetro a una densidad óptica de 260 nm, en una dilución de 1/5. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C.

III.5.1.2.4. Extracción del ADN a partir de las muestras de plasma, CMSP y saliva

Doscientos microlitros de saliva y de plasma, así como 10^6 CMSP de cada paciente y 10 μL de H_2O bidestilada (control negativo) se sometieron al protocolo de extracción de ADN para fluidos orgánicos del estuche comercial *QIAamp[®] DNA Mini Kit* (QIAGEN, Alemania), según las indicaciones del fabricante. La concentración del ADN en las muestras de saliva y CMSP se determinó a partir de diluciones 1/5 y 1/10; respectivamente a una densidad óptica de 260 nm.

III.5.2. Normalización del qRT-PCR para cuantificar el ADN del HVH-8

Hasta el momento, en Cuba no existía disponible una herramienta para cuantificar de forma absoluta el ADN del HVH-8 en muestras clínicas de pacientes con sospecha de su infección. Para cumplir con los objetivos específicos planteados, se normalizó un protocolo de qRT-PCR para determinar el número de copias del ADN del HVH-8 mediante la plataforma de *LightCycler 1.5* (Roche Diagnostics, Alemania) disponible en el laboratorio de ITS, del IPK (Anexo 9).

III.5.2.1. Obtención de ADN estándar para construir la curva externa de calibración

Se obtuvieron los ADN estándares mediante tres de las vías que se reportan a nivel internacional: clonaje del gen ORF26 en un vector (acápite III.5.2.1.3) (176), productos purificados de PCR (acápite III.5.2.1.2) (177, 178) y ADN genómico (ADNg) de la línea celular BCBL (acápite III.5.2.1.1) (179). Esta línea celular se encuentra infectada de forma latente con el HVH-8, fue donada gentilmente por los Drs Patrick Moore y Yuan Chang (Universidad de Columbia, EUA).



III.5.2.1.1. Obtención de ADNg

Doscientos microlitros de una suspensión de la línea celular BCBL se sometieron a extracción de ADNg por el estuche comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, EUA), según las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en 100 µL de tampón de Elusión y se determinó su concentración en espectrofotómetro (GeneQuant II, Pharmacia Biotech, EUA) a una densidad óptica (DO) de 260 nm. Todas las mediciones de la DO se realizaron en el mismo equipo.

III.5.2.1.2. Obtención de los productos de PCR del gen ORF26

Cinco microlitros de ADNg previamente extraído (acápite III.5.2.1.1) se sometieron a PCR cualitativa para amplificar un fragmento de 111 pb del gen ORF26 del HVH-8 mediante los cebadores reportados por Watzinger y colaboradores en el año 2004 (ORF26 oligonucleótido positivo: 5'-GTGCTC GAATCC AACGGA TT-3' y ORF26 oligonucleótido negativo: 5'-GATATTTT GGAGTAGATGTGGTACAC-3') (176). La mezcla de reacción contenía: 10 mM de Tampón de PCR; 25 mM de MgCl₂; 25 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado; 10 pmol de cada cebador (sentido positivo y sentido negativo) y 2,5 U de Enzima Taq polimerasa (Amplitaq, Roche Diagnostics, Alemania).

Los ciclos de amplificación se programaron de la siguiente forma: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min; seguido de cuarenta ciclos de repeticiones de 94 °C por 1 min, 52 °C para la hibridación por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se purificaron mediante el estuche comercial MiniElute[™] Purification Kit (QIAGEN, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se determinó su concentración en espectrofotómetro a una DO de 260 nm.

III.5.2.1.3. Obtención del ADN plasmídico (ADNp)

El fragmento de 111 pb del gen ORF26 que se amplificó mediante PCR cualitativa (acápite III.5.2.1.2) se insertó en el vector pTARGET[™] (PROMEGA, EUA) y posteriormente se clonó en células electrocompetentes *XL blue*. De las posibles colonias transformantes que aparecieron, se seleccionaron al azar veinte colonias blancas para ser sembradas en placas de LB sólido con Ampicillín. Al día siguiente, se les realizó extracción del ADN a los clones recombinantes mediante la metodología descrita en el estuche comercial ADNp Miniprep (Promega, EUA). La calidad del ADNp extraído se determinó mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8 % en TBE 1x. Para determinar las posibles colonias recombinantes, se realizó PCR cualitativa del gen ORF26 a diez de las veinte colonias transformantes seleccionadas, utilizando el mismo protocolo que se empleó para la obtención del fragmento de 111 pb del ORF26 del HVH-8 (acápite



III.5.2.1.2). Posteriormente, se determinó la concentración del ADNp extraído de una de las colonias recombinantes en espectrofotómetro a una DO de 260 nm.

III.5.2.2. Cuantificación de los ADN estándares por qRT-PCR

El número de copias de cada uno de los estándares obtenidos se determinó en el equipo *LightCycler 1.5* (Roche Diagnostics, Alemania). Para ello se añadieron (por triplicado) dos microlitros de cada estándar a capilares que contenían una mezcla compuesta por: 3 μL de H_2O , 4 μL de mezcla Universal de PCR (Roche Diagnostics, Alemania), 300 nM y 200 nM de oligonucleótidos y sonda, respectivamente. La secuencia de los cebadores y de la sonda fue reportada previamente por Watzinger y colaboradores (176), pero en el presente estudio se empleó un ligando del surco menor en el extremo 3' para marcar la sonda (MGB: siglas del inglés *Minor Groove Binder*) (ORF26 MGBTM: 5'FAM-TGT TCCCATGGTCGTGCC-MGB3'). Los parámetros del ciclaje fueron los siguientes: 95 °C por 10 min y 50 ciclos compuestos por: 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min y 72 °C durante 1 seg.

Una vez conocido el punto de corte (Cp siglas del inglés *crossing point*) de cada uno de los estándares, se procedió a importar la curva externa patrón previamente construida con estándar sintético del estuche comercial *artus[®] CMV LC PCR kit* (Roche Diagnostics, Alemania; rango de detección: 10^4 - 10 copias/ μL). Para la construcción de dicha curva se siguieron las instrucciones del fabricante y se empleó el Método de la Derivación Secundaria Máxima (SDMM: siglas del inglés *Second Derivative Maximum Method*) de la versión 3.3 del programa del *LightCycler*.

III.5.2.3. Confección de las Curvas estándares

Una vez que se determinó el número de copias de los estándares obtenidos (ADNp, productos purificados de PCR y ADNg) se confeccionaron tres curvas estándares con cada uno de ellos. Para esto se realizaron diluciones seriadas en base 10 en H_2O libre de ARNasa-ADNasas de los tres productos (desde 10^6 copias de virus/ μL hasta 10 copias de virus/ μL). Se añadieron tres réplicas de cada una de las diluciones de los productos estándares a capilares que contenían 15 μL de una mezcla formada por: 3 μL de H_2O , 4 μL de mezcla Universal de PCR (Roche Diagnostics, Alemania), 300 nM y 200 nM de oligonucleótidos y sonda; respectivamente.

Se emplearon los mismos parámetros del ciclaje que se describieron previamente en el acápite III.5.2.2. Al finalizar el último ciclo, por medio de análisis de regresión lineal, el programa del *LightCycler* produce un gráfico de la curva estándar en el que relaciona la concentración logarítmica (eje x) con el Cp de cada uno de los estándares (eje y) con 95 % de intervalo de confianza. Para la construcción de las curvas externas estándares se utilizaron los valores medios



del Cp de cada una de las réplicas mediante el modo aritmético del método SDMM del programa del *LightCycler* (versión 3.3). Posteriormente, todas las curvas se exportaron y archivaron en el equipo.

III.5.2.4. Selección de la curva externa estándar para cuantificar el ADN del HVH-8 en diferentes muestras clínicas

Con el objetivo de seleccionar una de las curvas patrón para cuantificar el HVH-8 en las muestras clínicas de los pacientes, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros. Algunos de ellos se calculan automáticamente por el programa del equipo *LightCycler 1.5*:

Slope: Se utiliza para evaluar la eficiencia de la reacción (para lograr una eficiencia de la curva estándar entre 1.5 y 2.2, este debe estar entre -5.7 y -2.9 según las recomendaciones del fabricante) (Slope = inclinación o pendiente de la curva según traducción al español).

Error: señala las variaciones entre capilar y capilar (e.g.: por errores en el pipeteo). Un valor de 0.6 corresponde a una desviación del valor x (concentración) de hasta el 50 %.

Intercept: Se utiliza para evaluar la sensibilidad de la reacción del qRT-PCR, mientras menor sea el valor del Cp en la ecuación de regresión mayor será la sensibilidad del sistema (Intercept = intercepción según traducción al español).

r: Coeficiente de regresión. Ofrece un control de la adecuada distribución lineal de la curva. Señala posibles errores sistemáticos e.g.: error acumulado en las diluciones seriadas.

Límite de detección: Se identificó según la última dilución en la que el sistema fue capaz de detectar el ADN diana en el mismo Cp para el 100 % de todas las réplicas.

Especificidad: ADN previamente extraído de tres cepas de CMVh, VHS-2 y VVZ obtenidas en el Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK, se sometieron al qRT-PCR normalizado.

III.5.3. qRT-PCR para cuantificar el ADN del HVH-8 en muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y sus contactos

Para reducir la variabilidad en la concentración del ADN obtenido en cada muestra clínica y su efecto en la cuantificación del HVH-8, se equilibraron todas las muestras de saliva, CMSP y tejido a la concentración de 100 ng de ADNg. Por tanto, a cada capilar se añadieron 10 μ L (100 ng de ADN) del ADN extraído de cada una de las muestras clínicas. Al no poder determinar la concentración de ADNg extraído de la muestra de plasma debido a la escasa cantidad de material genético en este fluido, se emplearon entonces 10 μ L del ADN diluido en el tampón de elusión para cada uno de los pacientes.

Los capilares contenían la misma mezcla de reacción que se citó en el acápite III.5.2.2, con igual concentración de cebadores y sonda. Además, para el qRT-PCR de muestras clínicas se



emplearon las mismas condiciones de ciclaje. En cada ensayo se incluyeron los siguientes controles: 10 μL de agua libre de ARNasa-ADNasa (control negativo), 10 μL del control negativo de la extracción, 5 μL de ADN_g extraído de la línea celular BCBL (control positivo) y 10 μL de una de las réplicas de las diluciones del ADN estándar.

Al final de la corrida del qRT-PCR de las muestras clínicas se importó la curva externa estándar construida a partir del ADN_g con vistas a comparar los valores de los C_p obtenidos en cada una de las muestras con los valores del C_p de la curva patrón (acápite III.5.2.3). El número de copias presente en cada una de las muestras se calculó mediante regresión lineal a través del programa del *LightCycler* (versión 3.3). Así se consideró que las muestras clínicas eran negativas si el valor del C_p sobrepasaba el ciclo 40 del qRT-PCR y se reportó entonces como muestras con CV del HVH-8 no detectable (ndt). Los resultados de la CV del HVH-8 en las muestras de saliva, tejido y CMSP se informaron en número de copias/100 ng de ADN, mientras que en las muestras de plasma se reportó como número de copias/ μL .

Para evitar las posibles contaminaciones se tuvo en cuenta varias medidas. En primer lugar, se utilizaron locales específicos con el equipamiento e instrumental necesario para obtener y procesar cada uno de los ADN estándares. En los gabinetes de Bioseguridad siempre se trabajó con puntas con barreras libres de ARNasas-ADNasas. Durante la extracción del ADN se incluyeron 10 μL de H_2O libre de ARNasas-ADNasas que fueron tratados en igualdad de condiciones que las muestras clínicas. En cada ensayo del qRT-PCR se incluyó un control de las mezclas al que se le añadieron 10 μL de agua libre de ARNasa-ADNasas.

Los inhibidores en la muestra clínica y/o efectos por errores durante la extracción del ADN se descartaron mediante la amplificación de un fragmento de 110 pb del gen de la β -globina humana. Con este fin se empleó el juego de cebadores, sonda y protocolo de qRT-PCR publicado por Schmitz y colaboradores en el año 2009 (180). Cien nanogramos del ADN_g obtenido de saliva, tejido y CMSP se adicionaron a capilares que contenían 15 μL de una mezcla formada por: 3 μL de H_2O , 4 μL de mezcla Universal de PCR (Roche Diagnostics, Alemania), 10 pmol de cebador sentido positivo y negativo, más 5 pmol de la sonda fluorogénica. Tras un paso inicial de desnaturalización del ADN a 94 °C por 10 min, los capilares se sometieron a 45 ciclos en el siguiente orden: 94 °C por 15 seg, 50 °C durante 20 seg y 60 °C por 40 seg cada uno. Finalmente, se determinó que la muestra no contenía ningún inhibidor en aquellos capilares en los que el equipo detectó un aumento de la fluorescencia por el encima del umbral (C_p).



III.6. Infección por HVs linfotropos en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico

III.6.1. Universo de estudio

III.6.1.1. Pacientes y muestras clínicas

Se incluyeron todos los pacientes seropositivos al VIH en los que se diagnosticó un Síndrome Adénico en la consulta especializada del IPK durante los años 2009 y 2010. Se consideró que el paciente tenía un Síndrome Adénico cuando aparecía un aumento de volumen de los ganglios linfáticos que podía estar acompañado o no de otros síntomas y signos (132).

Criterios de inclusión: todos los adultos seropositivos al VIH-1 que después de ser evaluados en la consulta especializada del IPK por médico especialista accedieran a realizarse excéresis quirúrgica de uno de los ganglios aumentados de tamaño con fines diagnósticos.

Criterios de exclusión: todos los pacientes que no consintieron con el proceder quirúrgico, los que previamente tenían diagnóstico de enfermedad maligna del sistema hemolinfopoyético y aquellos en los que clínicamente se estableció que el Síndrome Adénico era la expresión clínica de la infección primaria por el VIH (Retrovirosis Aguda).

Finalmente, se colectaron de forma simultánea 142 muestras clínicas de 49 pacientes, en el momento de la excéresis quirúrgica del ganglio linfático, entre ellas: 49 fragmentos de ganglios linfáticos, 48 muestras de saliva y 45 de suero. Un personal calificado del departamento de laboratorio clínico del IPK le extrajo a cada participante cinco mililitros de sangre venosa periférica que se vaciaron en tubo seco. El tubo que contenía la sangre se centrifugó a 3000 xg durante 15 min a temperatura ambiente y luego se dispensó el suero en tubos plásticos estériles de 1.5 mL. La saliva se colectó mediante emisión espontánea en tubos estériles de 1.5 mL. Todas las muestras debidamente rotuladas y acompañadas de indicación médica con los datos clínicos del paciente, se transportaron en condiciones de refrigeración al Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK cumpliendo estrictamente con la normas de Bioseguridad. Finalmente, se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

El ganglio linfático extraído quirúrgicamente se dividió en dos partes. Uno de los fragmentos se almacenó en tubo estéril seco y se transportó en condiciones de refrigeración al laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK donde se congeló a -20 °C hasta la extracción del ADN. El fragmento restante del ganglio se transportó a temperatura ambiente al departamento de Anatomía Patológica del IPK donde se fijó en formol al 10 % tamponado, tanto para la tinción (hematoxilina y eosina, *Ziehl Neelsen*) como para la inmunohistoquímica (IHQ).



La IHQ se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica del INOR solamente en fragmentos de ganglios linfáticos de pacientes con diagnóstico histopatológico de LNH. Las células del tejido linfoide se caracterizaron mediante Acs monoclonales contra conjuntos de diferenciación específicos (CD siglas del inglés *Cluster of differentiation*) presentes en la membrana de los linfocitos. Los CD constituyen marcadores inmunofenotípicos únicos cuya expresión depende del grado de diferenciación y la actividad que realiza la célula (181). Se intentó detectar las siguientes moléculas mediante IHQ: CD3 (marcador de células T), CD20 (marcador de células B), CD30 (se expresa en células B y T activadas), CD45 (Ag común de leucocitos), Ag Ki-67 (Ags nucleares asociados con proliferación celular), proteína latente de membrana 1 (LMP-1 siglas del inglés *latent membrane protein 1*) del VEB (proteína integral de membrana del VEB).

III.6.2. Marcadores virológicos de infección por HVs linfotropos

III.6.2.1. ELISA para la detección de Acs anti CMVh, VEB y HVH-6

Se realizaron diferentes técnicas serológicas con el objetivo de conocer el status inmunológico contra CMVh, VEB y HVH-6. En el caso del CMVh se determinó la presencia de anticuerpos IgM e IgG mediante ELISA comercial (Smart-Test, Alemania). Para la caracterización serológica de la infección por el VEB se realizaron determinaciones de IgM-VCA (siglas del inglés *Viral capsid antigen*), IgG-VCA y IgG-EBNA (siglas del inglés *Epstein Barr nuclear antigen*) de la misma casa comercial. Para el HVH-6 solo se pudo detectar la presencia de Acs IgG mediante ELISA comercial (Diasorin, Italia). Para el uso de cada estuche comercial se siguieron las recomendaciones del fabricante. La infección por HVs se clasificó teniendo en cuenta los resultados de los ensayos serológicos individuales de la siguiente forma:

Individuo no infectado: paciente en el que no se detectaron Acs específicos contra determinado HVs en la muestra de suero (IgM negativo + IgG negativo).

Individuo infectado: paciente en el que se detectaron Acs IgG en suero contra determinado HVs (e.g. IgG anti-HVH-6 positivo).

Infección primaria: detección de Acs IgM en el suero de pacientes en ausencia de Acs IgG. En los marcadores serológicos del CMVh se consideró IgM positivo + IgG negativo. En la infección primaria por el VEB se consideró el siguiente patrón serológico: IgM-VCA positivo + IgG-VCA negativo + IgG-EBNA-negativo.

Reactivación viral: cuando se detectaron Acs IgM e IgG contra CMVh. En cambio, para el VEB el patrón serológico fue: IgM-VCA positivo + IgG-VCA positivo + IgG-EBNA positivo.



Infección latente: cuando se detectaron Acs IgG a cualquiera de los HVs en ausencia de Acs IgM en el suero. En el caso específico del VEB: IgM-VCA negativo + IgG-VCA positivo + IgG-EBNA positivo.

Según los resultados de la serología del HVH-6 sólo se definió si el paciente estaba infectado o no por este agente, pues solo se investigó la presencia de Acs IgG en el suero.

III.6.2.2. qRT-PCR de HVs linfotropos en ganglios linfáticos y saliva

Con el objetivo de lisar los fragmentos de ganglios linfáticos, se añadieron 10 mg del tejido congelado de cada paciente en tubos plásticos estériles de 2 mL que contenían 180 µL de tampón de lisis (ATL) del estuche comercial *QIAamp® DNA Mini Kit* (QIAGEN, Alemania) y una perla de acero inoxidable de 5mm (QIAGEN, Alemania). Los tubos se colocaron entonces en el equipo Tissue LyserII (QIAGEN, Alemania) en el que se les aplicó una frecuencia de 30 Hz durante 30 min. El homogenizado obtenido se sometió a extracción manual del ADN según las recomendaciones del fabricante en el protocolo de extracción de ADN a partir de tejido de este estuche comercial. Asimismo, se realizó extracción de ADN a partir de 200 µL de saliva según el protocolo de extracción de fluidos y células del mismo estuche comercial. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su amplificación selectiva a través de qRT-PCR.

La CV del HVH-8, CMV, HVH-6 o VEB se determinó en muestras de saliva y tejido de pacientes con Síndrome Adénico mediante protocolos específicos de qRT-PCR. Para cuantificar el ADN del HVH-8 se empleó el protocolo normalizado en el acápite III.5.2, mientras que para determinar la CV del CMVh, HVH-6 y VEB se emplearon estuches individuales de la casa comercial TIB MOL BIOL (Alemania) según las recomendaciones del fabricante. En todos los ensayos de qRT-PCR se utilizó la plataforma *LightCycler 1.5* (Roche Diagnostics, Alemania). Los protocolos comerciales que se emplearon utilizan dos sondas de hibridación, una reconoce la secuencia homóloga del agente viral y la otra una secuencia del control interno de la reacción. Cada sonda emite fluorescencia a diferente longitud de onda que se identifica en el equipo por canales específicos. Además cada estuche incluye diluciones de ADN estándar desde 10^6 hasta 10 copias. Los resultados de la CV se informaron en número de copias por microlitro (copias/µL) y el límite de detección de estos protocolos de qRT-PCR es de 10 copias.



III.7. Caracterización molecular del HVH-8 en pacientes con algunas enfermedades asociadas con este agente

III.7.1. Universo de estudio

III.7.1.2. Pacientes y muestras clínicas

En el presente estudio se incluyeron todos los pacientes seropositivos al VIH-1 con diferentes enfermedades asociadas con la infección por el HVH-8 que se diagnosticaron durante el período 2005-2011 en el Laboratorio de ITS del IPK (Tabla III.2).

Tabla III.2. Muestras clínicas colectadas de pacientes con enfermedades asociadas al HVH-8.

Enfermedades asociadas con la infección por el HVH-8	Tejido	Líquido de efusión	Ganglio linfático	Saliva
SK-SIDA	37	-	2	-
LEP	-	3	-	-
LNH	-	-	1	-
LH	-	-		1
HLTV	-	-	1	-
Linfadenopatía relacionada con el SIDA	-	-	2	-
Total	37	3	6	1

Los pacientes con LEP que se incluyeron en esta investigación constituyen los tres primeros casos de este tipo de linfoma que se diagnostican desde el inicio de la epidemia del VIH en Cuba. Finalmente, se incluyeron 46 pacientes en los que se identificó en genoma del HVH-8 en alguna muestra clínica. Es válido aclarar que uno de los pacientes contribuyó con dos muestras, ya que a los seis meses de habersele diagnosticado el LEP en el pericardio, acudió a consulta por Síndrome Adénico causado por un SK ganglionar. Debido a que el subtipo y CV del HVH-8 se amplificó en momentos diferentes, incluso en distintas patologías, estos datos se incluyeron de forma independiente en el análisis estadístico.

III.7.2. Extracción de ADN de muestras clínicas

Para la lisis del tejido y extracción del ADN se siguió la metodología descrita previamente en el acápite III.6.2.2. En cuanto a los líquidos de efusión de los pacientes con LEP y la muestra de saliva se siguió el protocolo de purificación de ADN de fluidos orgánicos del estuche comercial *QIAamp® DNA Mini Kit* (QIAGEN, Alemania), según las recomendaciones del fabricante. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta su amplificación selectiva a través de PCR.

III.7.3. qRT-PCR para la cuantificación del HVH-8

Para determinar el número de copias del HVH-8 en el ADN purificado a partir de las muestras del tejido y fluido se empleó el protocolo normalizado en el acápite III.5.2.



III.7.4. PCR del fragmento del gen ORF-K1 del HVH-8 para secuenciación nucleotídica

Para la secuenciación nucleotídica de un fragmento del gen ORF-K1 se emplearon los cebadores y el protocolo de PCR publicado previamente por Zong y colaboradores (182). Durante la primera reacción se amplificó, directamente de las muestras clínicas, un fragmento de 870 pb de la región codificante del gen ORF-K1 (nt 105 al nt 974) utilizando los cebadores LGH2089 (5'-GTT CTG CCA GGC ATA GTC-3') y LGH2088 (5'-AAT AAG TAT CCG ACC TCAT-3'). Este producto amplificado se sometió entonces a la amplificación secundaria de un fragmento de 647 pb con los cebadores LGH2508 (5'-AGA TAC CAC ACA TGG TT-3') y LGH2090 (5'-GAG TGA TTT CAA CGC CTT AC-3') que cubren las dos regiones variables (RV1 y RV2).

Cinco microlitros del ADN_g de muestras clínicas se añadieron a tubos de reacción con 45 µL de una mezcla de reacción que contenía: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfatado, 20 pmoles de cada juego de cebadores (primera reacción LGH2089-LGH2088; segunda reacción LGH2090-LGH2508) más 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics, Alemania). Dos microlitros del producto amplificado durante la primera reacción se sometieron a la amplificación secundaria con los cebadores específicos. Después de un paso inicial de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 2 min se programaron 40 ciclos consecutivos de reacción en el siguiente orden: desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación de los cebadores a 50 °C por 1 min y un paso de extensión a 72 °C por 2 min. Se añadió, un paso final de elongación durante 5 minutos a 72 °C.

Finalmente, los productos de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % teñido con Bromuro de Etidio (0.5 µg/mL), visualizándose en transiluminador de luz UV. Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante el estuche comercial *MiniElute™ Purification Kit* (QIAGEN, Alemania), según las recomendaciones del fabricante. La concentración de los productos purificados de PCR se evaluó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % teñido con Bromuro de Etidio (0.5 µg/mL) con posterior visualización en transiluminador de luz UV.

III.7.5. Secuenciación nucleotídica

Para la secuenciación del fragmento amplificado se empleó el estuche comercial de la casa comercial *Beckman Coulter*, EUA; según las recomendaciones del fabricante. Cien femtomoles de los productos de la segunda reacción de PCR se añadieron a 2 tubos de PCR que contenían la siguiente mezcla de reacción: 5 pmol del cebador, 8 µL de reacción de secuencia (*DTCS Quick Star Master Mix*, EUA) y H₂O hasta un volumen final de 20 µL. En uno de los tubos se añadió el cebador sentido positivo y en el otro el cebador con sentido negativo (LGH2090 y LGH2508), por



tanto, por cada paciente se realizaron dos reacciones de amplificación para secuenciación nucleotídica. La reacción de secuencia tuvo lugar en termociclador en el que después de un paso inicial de 96 °C por 2 min se programaron 50 ciclos de reacción en el siguiente orden: 20 seg a 96 °C, 20 seg a 50 °C y 4 min a 60 °C. Los fragmentos obtenidos se purificaron según las recomendaciones del fabricante del estuche comercial Beckman Coulter, EUA. Al final, los productos purificados de la reacción de secuencia se resuspendieron en 40 µL de formamida que se separaron por electroforesis capilar en el secuenciador automático Beckman Coulter CEQ8800, EUA.

III.7.6. Análisis de la secuencias

Una vez concluida la electroforesis capilar se comprobó si el fragmento amplificado coincidía con el ORF K1 del HVH-8. Para comprobarlo se realizó una búsqueda inicial con el localizador de secuencias nucleotídicas BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EUA (NCBI siglas del inglés National Center for Biotechnology Information). Una vez concluida esta verificación, se empalmaron y editaron manualmente las secuencias obtenidas con ambos cebadores sentido positivo y negativo mediante el programa MEGA versión 4 (183). Para esto se utilizaron las secuencias de cepas de referencias obtenidas en el Banco de genes de los EUA. Las nuevas secuencias del HVH-8 que se identificaron en las muestras clínicas de los pacientes incluidos en la presente investigación se depositaron en el banco de genes mediante el programa Sequin versión 11.0. Los árboles de máxima verosimilitud se estimaron en PAUP 4.0 y el mejor modelo de sustitución nucleotídica se seleccionó a través del programa Modeltest 3.7 (184). El árbol resultante se editó mediante el programa Dendroscope (versión 2.7.4) (185).

III.8. Análisis estadístico

Con el objetivo de comparar la frecuencia de los casos en los que se detectó el ADN de alguno de los HVs en el LCR de pacientes seropositivos al VIH-1, antes y después de la introducción de la TARVAE se utilizaron datos previamente publicados por Kourí y colaboradores en el año 2000 (186). Mediante métodos de estadística descriptiva se analizaron las variables a través del paquete estadístico SPSS 11.5. Se construyeron tablas de contingencia y se calculó Chi cuadrado, estimándose la razón de prevalencia.

En el procesamiento y análisis estadístico de los resultados de la CV del HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos (acápite III.5) se emplearon los paquetes estadísticos SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) y Statgraphic. Se realizaron pruebas de comparación de proporciones entre las medias, se calculó Chi cuadrado y el coeficiente de correlación de Pearson para un 95% de confiabilidad. Los resultados se analizaron de dos formas:



Resultados Cualitativos: permitieron valorar la frecuencia de infección por el HVH-8. Tras realizar el qRT-PCR de todas las muestras clínicas, se consideraron casos positivos (sinónimo de infección) a todos los individuos en los que el sistema detectó más de 10 copias del ADN del HVH-8 en al menos una de las muestras analizadas. Se consideraron casos negativos o no infectados a todos aquellos individuos en los que no se detectó el genoma de este virus en ninguna de las muestras analizadas (CV del HVH-8 ndt).

Resultados Cuantitativos: valor numérico de la CV del HVH-8 que se detectó mediante el qRT-PCR en alguna de las muestras clínicas analizadas.

Sin embargo, en el estudio de la infección por HVs linfotropos en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico (acápite III.6) se confeccionó una base de datos con la información recogida en las encuestas individuales, así como de las HC individuales mediante el paquete estadístico *IBM SPSS Statistics version 19*. Se construyeron tablas de contingencia y se compararon las variables utilizando la prueba de Chi cuadrado o de Fisher según correspondiera, se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05. El riesgo se estimó con un intervalo de confianza del 95%. Para comparar los valores de la CV de los HVs linfotropos entre los diferentes compartimentos se empleó la prueba de ANOVA y en caso de significación estadística se realizó Prueba de Tukey con un nivel de significación de 0.05.

Del mismo modo, en el estudio de los subtipos y la CV del HVH-8 (acápite III.7) se confeccionó una base de datos con la información recogida de cada paciente mediante el paquete estadístico *IBM SPSS Statistics version 19*. Se construyeron tablas de contingencia y se compararon las variables utilizando la prueba de Chi cuadrado o de Fisher según correspondiera, se consideraron significativos los valores de p menores de 0.05. El riesgo se estimó con un intervalo de confianza del 95%. Para comparar los valores de la CV del HVH-8 en el tejido entre los diferentes subtipos, incluso entre las diferentes patologías se empleó la prueba de ANOVA y en caso de significación estadística se realizó Prueba de Tukey con un nivel de significación del 0.05. En la comparación de la CV del HVH-8 en tejido se excluyó al paciente con diagnóstico de LH por haberse cuantificado y secuenciado a partir de una muestra de saliva.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI

Se reporta que entre el 30 y el 70% de los pacientes con SIDA presentan síntomas neurológicos (187). Los resultados de las necropsias han permitido reconocer que es el cerebro el segundo órgano que con mayor frecuencia resulta afectado en estos pacientes (188). Entre las principales causas infecciosas que afectan el SNC de este grupo poblacional se encuentran los HVs humanos, los que pueden actuar como cofactores en la progresión de la infección por el VIH mediante las interacciones que establecen con ese retrovirus (189).

El escenario para los pacientes y médicos de asistencia cambió con el advenimiento del PCR ya que esta técnica permite identificar el agente etiológico en menos de 24 hrs. El diagnóstico rápido también favorece el empleo de la terapéutica antiviral oportuna y específica con mejor recuperación del paciente. Aún más, su uso evita que aparezcan manifestaciones neuropatológicas de larga duración (190, 191). Es por ello que actualmente constituye la herramienta diagnóstica más importante en el manejo de los pacientes con SNI, aunque por razones éticas, no se ha validado su sensibilidad y especificidad en comparación con la biopsia cerebral que se consideraba la técnica de oro (192).

IV.1.1 Frecuencia de infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI tras la introducción de la TARVAE

En el presente estudio se identificó la infección por HVs mediante el PCR anidado múltiple en 25 de los 241 individuos seropositivos al VIH-1 (10.4%). Algunas de las características demográficas de dichos pacientes se muestran en la tabla IV.1. El SNI por HVs apareció con mayor frecuencia en hombres de piel blanca cuyo promedio de edad fue de 31.7 años (Rango: 23-45). Las características generales de los pacientes seropositivos al VIH con SNI por HVs coinciden con los datos que caracterizan a la epidemia cubana de VIH. De forma general, se ha reconocido que la proporción hombre-mujer es de 4:1, que es más frecuente la infección por el VIH en HSH de piel blanca. Se ha descrito por algunos autores que la epidemia de Cuba es la de menor prevalencia en las Américas y una de las más bajas a nivel mundial (35, 193); aunque hace algunos años, de



Arazoza y colaboradores señalaron que la infección por el VIH mostraba una tendencia hacia el incremento a partir del año 1996 (194).

Tabla IV.1. Características sociodemográficas de la población (2001-2005).

Variables		No.	%
Grupos por edad (años)	15-24	1	4
	25-34	16	64
	35-44	6	24
	45-54	2	8
Sexo	Femenino	6	24
	Masculino	19	76
Color de la piel	Blanco	19	76
	Mestizo	2	8
	Negro	4	16

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK

La media del conteo de linfocitos T CD4+ que se realizó cerca del momento de presentación de los síntomas neurológicos fue de 137 cél/mm³ (Rango: 10 - 463 cél/mm³). De acuerdo con la definición clínica de caso SIDA (195) el 92% de los pacientes con diagnóstico de infección por HVs en el SNC se clasificaron en estadio C3, de los que sólo el 37.5% presentó conteo de linfocitos T CD4+ por encima de 200 células. En el presente estudio se encontró una asociación significativa entre la muerte del paciente a causa del SNI por HVs y el conteo de CD4 inferior a 200 células ($p < 0.05$), con lo que se resalta la importancia de la inmunidad celular en el control de la infección por estos agentes (196). La CV del VIH-1 sólo estuvo disponible en 10 de los 25 pacientes, con un valor medio de 125 243 copias/mL (Rango: 530 -740 000). El 70% de los pacientes presentó valores de CV del VIH-1 por encima de 55000 copias/mL y el 75% recibía TARVAE antes del inicio de los síntomas de la afección neurológica; tres de ellos tenían documentada mala adherencia al tratamiento (12%).

El 10.4% de los LCR incluidos en la presente investigación resultó positivo a la infección por HVs. Sin embargo, Quereda y colaboradores en el año 2000, demostraron que durante el período 1992-1998 en España estos agentes fueron los responsables del 34% de las infecciones del SNC en pacientes infectados con el VIH-1 antes del inicio de la TARVAE (197). No obstante, hay que resaltar que otros autores a nivel internacional reconocen que existe variabilidad en la incidencia del SNI por HVs en individuos seropositivos al VIH-1 en distintas áreas geográficas (198, 199). En Cuba, previamente se encontró que los HVs fueron los agentes etiológicos del SNI en el 22.5% de los pacientes seropositivos al VIH-1 durante el período 1996-1998 (186). Al comparar dicha frecuencia con el 10.4% que se detectó en la presente investigación (Período 2001-2005) se podría pensar que, tras la introducción de la TARVAE, se produjo una reducción en la frecuencia del SNI por HVs en estos individuos. Sin embargo, al comparar la frecuencia anual del SNI por



HVs en pacientes seropositivos al VIH-1 en Cuba se observa que su frecuencia se mantiene fluctuante (Figura IV.1). Esto sugiere que el comportamiento observado es independiente de la introducción de la TARVAE.

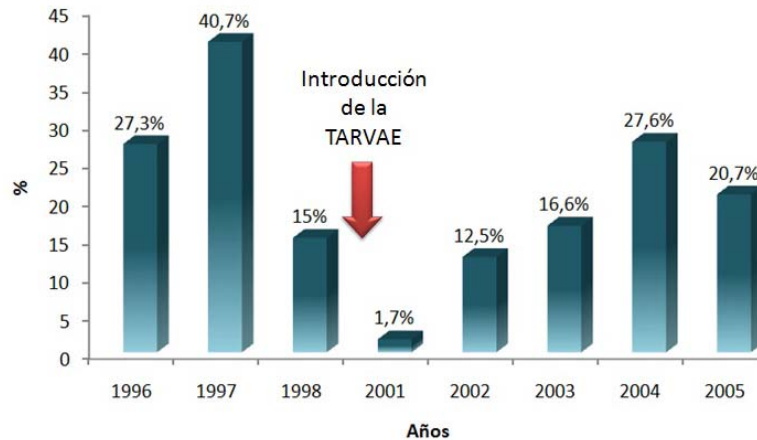


Figura IV.1. Distribución anual del porcentaje de detección de HVs mediante PCR anidado múltiple en LCR de individuos VIH positivos, antes y después de la introducción de la TARVAE en Cuba (1996-2005).

Fuente: Libro de entrada del Laboratorio de ITS, IPK

Desde el año 1997 comenzó a producirse una reducción en el porcentaje de identificación de HVs en el LCR de pacientes seropositivos al VIH hasta llegar a identificarse en el año 2001 la cifra menor, que coincidió con la introducción de la TARVAE en Cuba. Sin embargo, durante el 2001 el número de pacientes que recibían TARVAE era inferior a 400 (35), por lo que otros factores debieron haber incidido en la disminución en la incidencia de SNI por HVs. Esta tendencia a la reducción no se mantiene de igual forma a lo largo del período 2001-2005 ya que se identificaron cifras superiores al 20% en los años 2004 y 2005. Por todo lo anterior se plantea que, desde que se introdujo la TARVAE hasta el año 2005, se mantuvo una frecuencia variable de infección por HVs en el sistema nervioso de individuos seropositivos al VIH-1. Entonces, el impacto de la terapia en la incidencia del SNI por HVs se deberá evaluar en investigaciones futuras, pues no fue hasta el año 2003 cuando se logró el 100% de cobertura con medicamentos antiretrovirales genéricos. Los resultados obtenidos en el presente estudio denotan que la infección del SNC por HVs continúa siendo una causa importante del SNI en este grupo poblacional. Su diagnóstico deberá realizarse mediante técnicas sensibles de biología molecular en el LCR de individuos con signos y síntomas de SNI, independientemente del uso de antiretrovirales.

A diferencia de lo reportado por otros autores (200-202), Maschke y colaboradores no encontraron cambios significativos en la incidencia de encefalitis por CMVh entre dos grupos de individuos seropositivos al VIH-1, uno de ellos recibía tratamiento con antirretrovirales y el otro no (203). Otros autores señalaron el efecto transitorio del uso de la terapia en pacientes severamente



inmunodeprimidos antes de comenzar el tratamiento (204, 205). En ellos el uso de los ARV conduce a una protección inadecuada a largo plazo contra la enfermedad por CMVh ya que la respuesta inmune contra este agente disminuye a los 3 ó 5 años de iniciada la terapia. Aún más, varios autores han descrito el efecto inmunopatológico de la restauración inmune tras la introducción de la TARVAE como causa de enfermedad (206). A esta entidad clínica se le reconoce como Síndrome Inflamatorio por Inmunoreconstitución (IRIS: siglas del inglés *Immune reconstitution inflammatory syndrome*). Los HVs están entre los patógenos que con mayor frecuencia se asocian al IRIS de etiología infecciosa (207, 208).

En la presente investigación se detectó que el 44% de los casos de SNI por HVs fueron causados por el CMVh. En orden de frecuencia le siguieron el VEB y las coinfecciones en el SNC por más de un HVs (Figura IV.2). Las coinfecciones que se identificaron en el SNC de los 4 pacientes fueron: un paciente con CMVh/VEB y los 3 restantes por VHS/CMVh. Hay que destacar que en cinco pacientes también se identificó mediante la Técnica de Látex la coinfección por *Criptococo*. En dos de ellos se detectó el ADN del CMVh y en otros dos el genoma del VEB. En el último de estos pacientes también se identificó una coinfección del VHS con el CMVh.

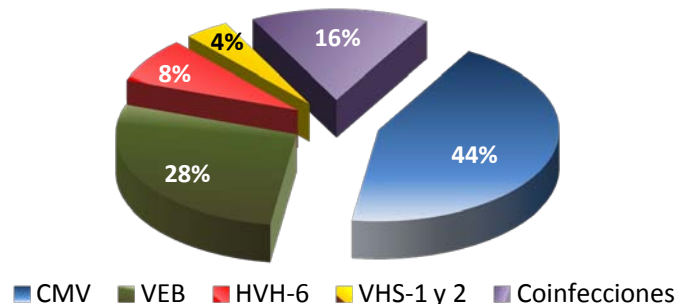


Figura IV.2. Frecuencia de detección de HVs en el LCR de individuos seropositivos al VIH-1 con SNI según resultados de PCR anidada múltiple (2001-2005).

Fuente: Libro de entrada del Laboratorio de ITS, IPK

La incidencia de la infección por HVs en el SNC varía de un país a otro a pesar que el CMVh constituye la causa más frecuente de encefalitis en individuos seropositivos al VIH-1 que evolucionan a SIDA (197, 209), sobre todo en aquellos con conteos de linfocitos T CD4⁺ muy bajos (inferior a 50-100 céls/ μ L) (191). Varios autores reconocen que el CMVh es el HVs más frecuente en ser detectado en el SNI de estos pacientes (198, 199). No obstante, otros como el VEB, el VHS y el HVH-6 también se detectan con una frecuencia variable (186, 210, 211). La identificación del ADN del VEB en el LCR de pacientes SIDA también se ha considerado un marcador pronóstico para el desarrollo de algunos tumores cerebrales (211).

En la presente investigación no se identificó ningún caso positivo al VVZ. La asociación de este agente con el SNI se ha reconocido como una rara infección oportunista que ocurre entre el 0.1 al



4% de pacientes SIDA con enfermedad neurológica (212). No obstante, otros autores han obtenido resultados diferentes (213). Por otra parte, se plantea que las coinfecciones en el SNC de pacientes VIH son frecuentes (133). Se han implicado varias asociaciones de agentes en la génesis del SNI debido a la detección simultánea en el LCR de: más de un miembro de la familia *Herpesviridae*, un HVs con otro agente viral (JCV siglas del inglés *JC virus*) y un HVs asociado con otros patógenos (*Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*) (214-216). Algunas de estas asociaciones se identificaron en necropsias de adultos con SIDA, en los que no se sospechó ni se diagnosticó este tipo de infección clínicamente *ante-mortem*. Ellas, posiblemente traducen la interacción patogénica de la infección viral y no viral en el SNC por mecanismos no identificados aún (217, 218).

IV.1.2. Relación de la infección por HVs en el SNC con el comportamiento clínico y epidemiológico del SNI de individuos seropositivos al VIH-1

Se estima que la infección por HVs en pacientes SIDA es indistinguible clínicamente, y no se han identificado hasta el momento síntomas o signos clínicos específicos. Tampoco se han identificado marcadores patognomónicos en el LCR que permitan suponer el diagnóstico etiológico viral específico (219, 220). Entre las principales manifestaciones clínicas del SNI por HVs que se encontraron en los pacientes cubanos que se estudiaron estuvieron: la fiebre, cefalea, vómitos y los signos de focalización neurológica (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Principales manifestaciones clínicas de pacientes SIDA con encefalitis con PCR anidado múltiple positiva a HVs en LCR.

Síntomas y signos del SNI	No.	%
Fiebre	21	84
Cefalea	17	68
Vómitos	16	64
Signos de focalización neurológica	7	28
Fotofobia	5	20
Coma	3	12
Convulsiones	3	12
Signos Meníngeos	2	8

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK

La identificación de signos de focalización neurológica se asoció con mayor riesgo de muerte (RR= 3; 1-11) (Tabla IV.3). Por tanto, su reconocimiento debe considerarse un signo de alarma en el manejo y seguimiento del SNI producido por HVs en adultos cubanos seropositivos al VIH-1. Sin embargo, no se identificó asociación significativa entre el diagnóstico específico de un HVs y el riesgo de muerte, el sexo, el color de la piel o la edad. Tampoco se identificó asociación entre el diagnóstico virológico de la infección por HVs y la coinfección con *Cryptococo*, o una manifestación clínica específica.



Tabla IV.3. Relación entre los signos de focalización neurológica y el estado de los pacientes al egreso.

		Estado al egreso		Total
		Fallecidos	Recuperados	
Signos de Focalización Neurológica	Sí	4	3	7
	No	3	15	18
Total		7	18	25

Además se encontró que aquellos individuos que se encontraban bajo TARVAE antes del inicio de los síntomas del daño neurológico tuvieron una mejor recuperación de la infección que los que no recibían antirretrovirales [$p < 0.05$, OR: 10 (1.2-81)]. En concordancia con otros estudios (221, 222), los resultados de la presente investigación evidencian el impacto favorable de la TARVAE en pacientes cubanos seropositivos al VIH-1, en relación con la recuperación de la infección por HVs en el SNC. (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Relación entre el estado de los pacientes al egreso y la condición de recibir TARVAE o no.

		Estado al Egreso		Total
		Fallecidos	Recuperados	
TARVAE	No	4	2	6
	Sí	3	15	18
Total		7	17	24*

* Datos no disponibles en 1 de los 25 pacientes.

IV.2. Infección por HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos

En la tabla IV.5 se muestran las variables sociodemográficas de la población que participó en el presente estudio. En ambos grupos se observó un predominio del sexo masculino, de piel de color blanca y mayor porcentaje de hombres que tienen sexo con hombres (HSH).

Tabla IV.5. Características sociodemográficas de la población estudiada (2004-2007).

Variables	SK-SIDA (N=49)	Contactos SK (N=22)
Media de Edad	38.2 años	36.5 años
Sexo	Femenino 2 (4.1%)	Femenino 7 (31.8%)
	Masculino 47 (95.9%)	Masculino 15 (68.2%)
Color de la Piel	Blanca 35 (71.4%)	Blanca 13 (59.1%)
	Mestiza 9 (18.4%)	Mestiza 4 (18.2%)
	Negra 5 (10.2%)	Negra 5 (22.7%)
Orientación Sexual	HT 5 (10.2%)	HT 9 (40.9%)
	HM 44 (89.8%)	HM 13 (59.1%)
Seropositividad al VIH	Sí 49 (100%)	Sí 15 (68.2%)
	-	No 7 (31.8%)

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK

En la tabla IV.6 se agrupan los principales datos clínicos de los pacientes seropositivos al VIH estudiados. El SK-SIDA cutáneo fue el más frecuente, y predominaron las lesiones en estadios



tempranos (estadio macular y de placas). Otros autores han descrito previamente que en el SK-SIDA predominan las lesiones en estadios tempranos (223, 224).

Tabla IV.6. Datos clínicos y de laboratorio de la población estudiada (2004-2007).

Variables		SK-SIDA (N=49)		Contactos (N=15)	
		No.	%	No.	%
SIDA por SK	Sí	33	67.3	-	-
	No	16	32.7	-	-
Debut clínico SIDA	Sí	15	30.6	2	13.3
	No	34	69.4	13	86.7
Conteo de linfocitos T CD4+ céls/mm ³	< 200	21	42.9	4	26.7
	200-499	21	42.9	9	60
	>500	7	14.2	2	13.3
CV del VIH* copias/mL	< 10 000	23	54.8	5	45.5
	> 10 000	19	45.2	6	54.5
SK según localización macroscópica	Cutáneo	35	71.4	-	-
	Mucocutáneo	7	14.3	-	-
	Diseminado	7	14.3	-	-
SK según diagnóstico histopatológico	Estadio inicial	16	32.6	-	-
	Estadio de placas	7	14.3	-	-
	Estadio Tumoral	14	28.6	-	-
	No clasificado	12	24.5	-	-

* 7 pacientes con SK-SIDA y 4 contactos de pacientes con SK-SIDA no tenían realizada CV del VIH.

ndt: no detectable

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK

El diagnóstico por qRT-PCR de la infección por el HVH-8 ha demostrado ser una herramienta muy sensible y reproducible. En especial, aquellos protocolos que tienen por diana al gen ORF-26. Este se expresa en las células fusiformes de todas las variantes clínicas y estadios histológicos del SK (225, 226). Hasta el momento en el que se realizó esta investigación no se había evaluado mediante qRT-PCR la hipótesis de la infección sistémica en diferentes fluidos y células del HVH-8 en pacientes con SK-SIDA, así como en contactos asintomáticos de estos individuos. Los estudios sobre la patogenia de la infección y posibles vías de transmisión del HVH-8 han empleado técnicas anidadas de PCR a punto final. Estos sistemas anidados aumentan la sensibilidad del sistema pero incrementan el riesgo de contaminaciones y no permiten diferenciar entre una infección latente ó lítica (227, 228).

A través del presente estudio se logró normalizar un qRT-PCR para determinar la CV del HVH-8 en el Laboratorio de ITS del IPK. En primer lugar, se obtuvieron tres tipos de ADN estándar para la construcción de las curvas patrón. Se logró satisfactoriamente el clonaje del gen ORF26 en el vector pTARGETTM en células electrocompetentes *XL blue*. El PCR del gen ORF-26 realizado al ADN obtenido de 10 de las 20 colonias transformantes seleccionadas permitió reconocer que en



nueve de ellas (45%) se amplificó el fragmento clonado (Figura IV.3). También se logró obtener los productos purificados de PCR del gen ORF26 y el ADNg de la línea celular BCBL.

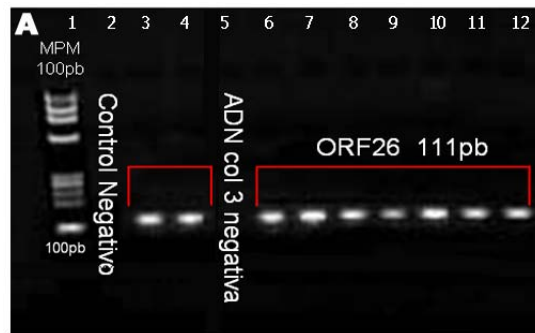


Figura IV.3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 4% de los productos del PCR cualitativo del fragmento del gen ORF 26 que se realizó en 9 colonias recombinantes.

La obtención del ADN estándar se considera uno de los pasos más complejos para normalizar un ensayo de qRT-PCR, ya que hasta el momento no se cuenta con estándares universales que permitan estandarizar estos sistemas a nivel internacional (229). Estos ensayos se reconocen en la literatura como qRT-PCR caseros (228) y constituyen la única alternativa con la que se podrá contar en un futuro próximo para la cuantificación de agentes de relevancia clínica (151). Actualmente, se comercializan con precios muy elevados algunos ensayos comerciales para un limitado número de patógenos, dentro de los que se encuentran: el VIH-1, VHB, VHC, CMVh, entre otros (230, 231).

De esta forma, los tres productos obtenidos en la presente investigación (ADNp, productos purificados de PCR y ADNg) representan una fuente reproducible de ADN estándar para la puesta en marcha del qRT-PCR para la cuantificación del ADN del HVH-8 en el laboratorio de ITS del IPK, en Cuba. Varios autores señalan lo difícil que resulta obtener productos estables para la cuantificación por qRT-PCR, tanto por el tiempo que consume su producción como por la dificultad para cuantificarlos (232, 233). A pesar de ello, múltiples investigadores han utilizado algunas de estas vías para su obtención (234, 235).

La validez de los ADN estándares obtenidos se determinó mediante la comparación de diferentes parámetros derivados de las curvas estándar construidas con cada uno de ellos. Los resultados de la corrida del qRT-PCR de los tres ADN estándares mostraron una fuerte correlación lineal ($r = -1$) con valores muy bajos de error a lo largo de seis magnitudes de concentración de ADN diana en cada una de las curvas estándar construidas (Figura IV.4). Con esto se denota la confiabilidad de los tres sistemas para la cuantificación del HVH-8.

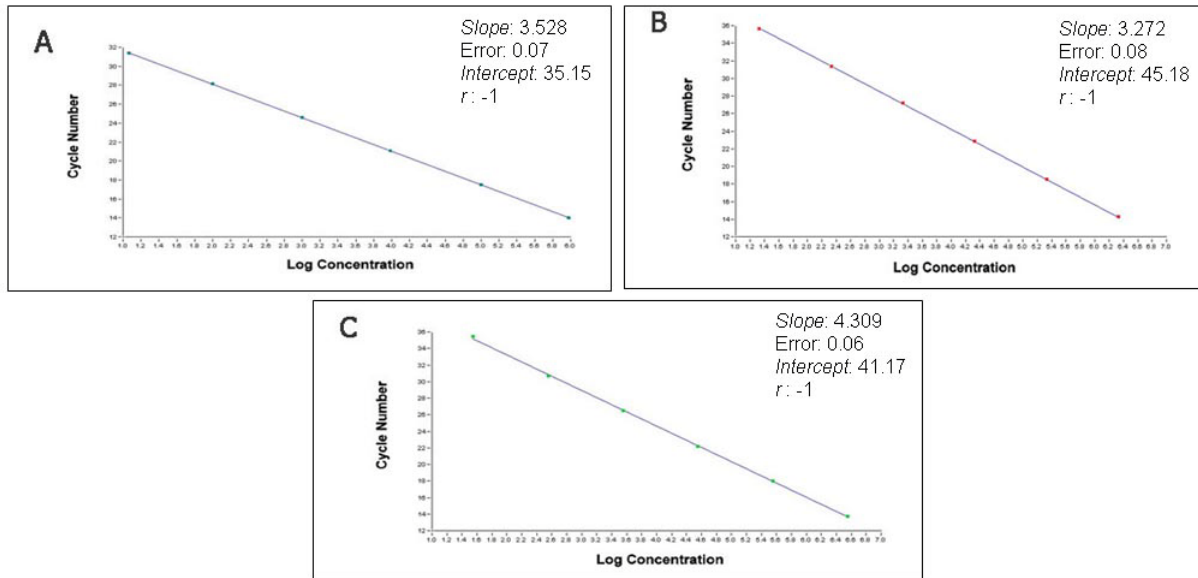


Figura IV.4. Curvas estándares construidas a partir de las diluciones en base 10 de los ADN estándares obtenidos. **A:** empleando ADNg de la línea celular BCBL. **B:** a partir de los productos purificados de la PCR del gen ORF26. **C:** utilizando el ADNp. **Cycle number:** representa el número del ciclo en el que se detectó incremento de la fluorescencia por encima del umbral (Cp de la dilución del ADN estándar). **Log Concentration:** representa la concentración logarítmica de cada dilución del ADN estándar.

Históricamente, las curvas estándar han sido el método de elección para determinar la concentración absoluta de ADN (229). Larionov y colaboradores afirmaron que si se utilizan buenas prácticas de laboratorio es fácil obtener curvas de suficiente calidad, siempre y cuando se incluya un adecuado número y rango de diluciones de productos estándares (236). No obstante, algunos autores cuestionaron el empleo de curvas estándar externas en la cuantificación por qRT-PCR. Según ellos, este método sufre de variaciones inter-capilares que son incontrolables y no monitoreables (237). Sin embargo, Niesters en el año 2001 no encontró variaciones en los parámetros de las curvas estándar construidas para cuantificar el ADN del CMVh (230). En concordancia con ello, Kuhne y Oschmann demostraron la factibilidad de importar las curvas estándares en diferentes corridas realizadas con equipos *LightCycler* (238), lo que fue corroborado posteriormente por Arezi y colaboradores (239).

No existe hasta el momento un método consenso para evaluar las curvas estándar. El método que con mayor frecuencia se utiliza para evaluar la eficiencia del qRT-PCR se basa en el valor de la pendiente de la curva (240). Se acepta que la eficiencia ideal se logra cuando este parámetro es igual a -3.33 (241). Como las diferencias en la eficiencia influyen negativamente en el cálculo del número inicial de copias, se propone por algunos investigadores que la eficiencia del qRT-PCR se calcule a través de la fórmula: $E = 10^{-1/slope}$ (242, 243). En teoría, la eficiencia óptima del PCR debe ser igual a 2 ya que cada producto del PCR se replica una vez por ciclo. Sin



embargo, se reconoció que mediante esta fórmula en algunos estudios se ha obtenido una eficiencia superior al valor óptimo, lo que es prácticamente imposible en la teoría de la amplificación del PCR (233). Por otra parte, otros autores recomiendan que la sensibilidad del qRT-PCR se evalúe a través de la intercepción de la curva estándar. Según ellos a menor valor de este parámetro mayor sensibilidad del ensayo (244-246).

Por todo lo anterior, se decidió evaluar las curvas estándares obtenidas según los valores de intercepción y la pendiente de la curva. Se reconoció que la curva patrón construida con el ADNg de BCBL mostró mayor sensibilidad (*Intercept* = 35.15) (Figura IV.4). No obstante, con ella y la de los productos de PCR se obtuvieron valores de la pendiente más cercanos al de máxima eficiencia de amplificación (*Slope* -3.33). El límite inferior de detección del qRT-PCR normalizado varió entre los ADN estándares. Se encontró que con la curva estándar del ADNp y la de productos purificados de PCR se detectó hasta 100 copias. Por el contrario, con la curva estándar del ADNg de BCBL se logró un límite de detección de hasta 10 copias (Figura IV.5).

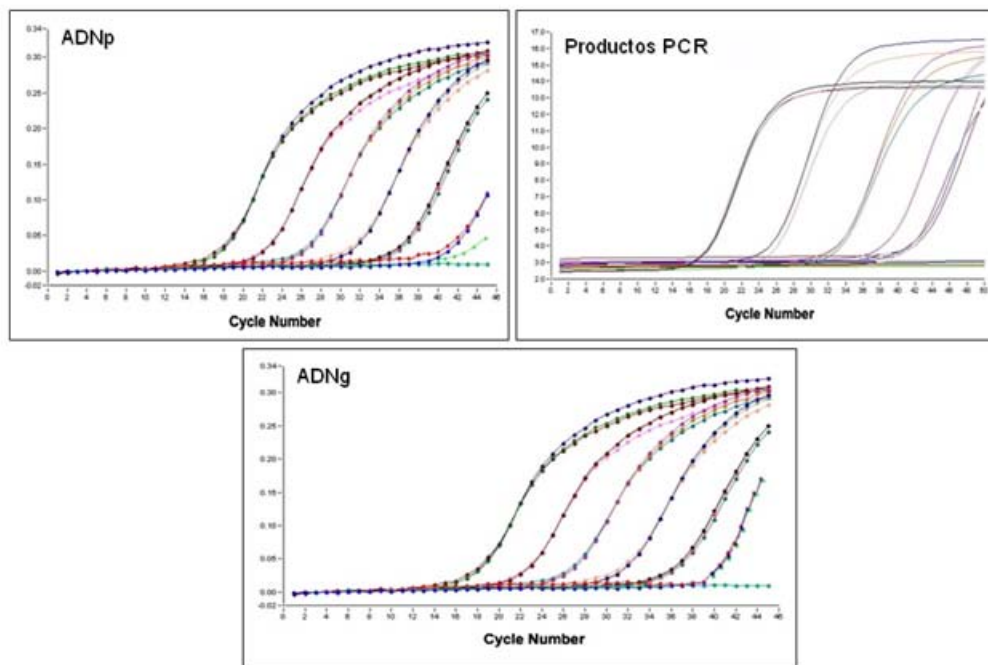


Figura IV.5. Límite inferior de detección del qRT-PCR normalizada para la cuantificación del HVH-8 a partir de: ADN plasmídico (ADNp), productos de PCR del gen ORF26 y empleando ADNg de la línea celular BCBL. **Cycle number:** Número de ciclo; **Log Concentration:** Concentración logarítmica.

Varios autores describieron que altas o bajas concentraciones de productos estándar pueden afectar la relación lineal del C_p en la curva estándar. Cuando se trabaja con concentraciones elevadas es difícil establecer la línea basal de fluorescencia ya que a estas concentraciones el valor del C_p se alcanza durante los primeros ciclos de amplificación (229, 247). Del mismo modo, se identificaron algunos factores que influyen de forma negativa en la detección y cuantificación de



concentraciones bajas de moléculas dianas (248). Entre ellos se encuentran: los errores en las diluciones de los estándares por la distribución estequiométrica de las moléculas (249), la labilidad del ADN almacenado en soluciones a bajas concentraciones por largos períodos (250), y el uso de viales plásticos que producen una reducción del doble de la concentración en soluciones con bajo número de copias (251). Por este motivo, Ellison y colaboradores recomendaron que para obtener una curva estándar óptima se incluyan las diluciones de los estándares en los que el 100% de sus réplicas sean detectados por el sistema. Con ello se evita el problema inherente al trabajo con soluciones de baja concentración de ácidos nucleicos (247). No obstante se cuestiona la importancia clínica que tenga una variación de la concentración en la CV inferior de 1 000 copias (230).

El qRT-PCR normalizado en el presente estudio probó ser muy específico para la cuantificación del HVH-8 al no detectarse incremento por encima del umbral de fluorescencia en los capilares que contenían ADN extraído de las cepas de CMVh, VHS-2 y VVZ. Al comparar los parámetros de las curvas estándares obtenidos con los del protocolo original (176), se encontró que con la curva estándar del ADN_g de BCBL se logró mejor eficiencia de la reacción, incluso con mayor sensibilidad. Esta diferencia se piensa esté relacionado con el empleo del MGB en el marcaje de la sonda que se utilizó en la investigación actual. Se ha reconocido por varios autores que su empleo garantiza una unión mucho más específica y estable a la secuencia diana del ADN (252, 253). Debido a los resultados obtenidos con esta curva estándar y por permitir detectar un menor número de copias de secuencias dianas (10 copias de ADN) se decidió seleccionar el ADN_g como ADN estándar para cuantificar el ADN del HVH-8 en las muestras clínicas.

IV.2.1. Frecuencia de infección del HVH-8 y CV en diferentes muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y sus contactos

Según los resultados que se obtuvieron en la presente investigación se conoció que el 98% de los individuos cubanos con SK-SIDA y el 72.7 % de los contactos asintomáticos estaban infectados con el HVH-8. Según el orden de frecuencia, el ADN del HVH-8 se detectó en muestras de tejido, saliva, CMSP y plasma de pacientes con SK-SIDA (Figura IV.6); incluso en el 67% de ellos el genoma de este HVs se amplificó en más de dos muestras clínicas. La frecuencia de detección del ADN del HVH-8 en muestras de tejido coincide con el reporte previo de Kennedy y colaboradores, quienes emplearon un protocolo de qRT-PCR para su detección (254). Sin embargo, existe variabilidad en la frecuencia de identificación de su ADN en CMSP y plasma de individuos con SK-SIDA residentes en América, Europa y África en la era post-TARVAE (rango desde 30% al 82%) (255-259). Por otra parte, a pesar que los estudios iniciales realizados en



pacientes con SK-SIDA sugirieron que el HVH-8 no estaba presente en la saliva de los mismos (260), posteriormente se comprobó su presencia en este fluido (261).

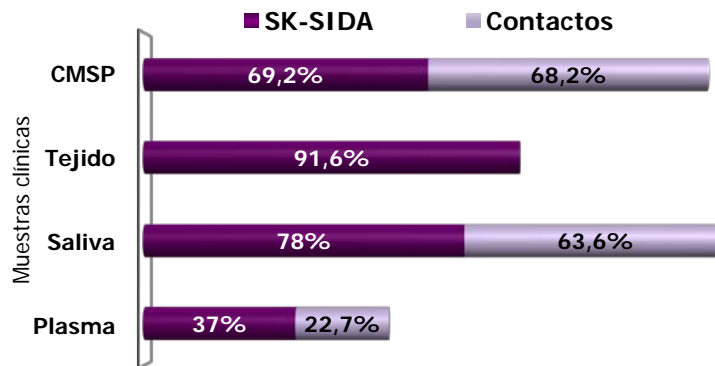


Figura IV.6. Frecuencia de casos infectados por HVH-8 según resultados del qRT-PCR en muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y contactos sin evidencias clínicas de SK.

La frecuencia de detección del ADN del HVH-8 fue similar en CMSP y saliva de contactos asintomáticos, pero en las muestras de plasma fue menor (Figura IV.6). Además, se identificó su genoma en más de dos muestras clínicas del 59.1% de estos individuos (13/22). Así se confirma el hallazgo previo de nuestro colectivo sobre la presencia del ADN del HVH-8 en CMSP de contactos sexuales de pacientes con SK-SIDA (36). Aún más, añaden por primera vez en Cuba evidencias sobre la posible identificación del genoma de este agente en diferentes muestras clínicas de contactos asintomáticos y su posible impacto en la transmisión de este virus oncogénico a través de la saliva.

A pesar de que las investigaciones iniciales sugirieron que el HVH-8 se transmitía por la vía sexual y que sólo se detectaba en pacientes con SK, actualmente se reconoce que su infección es más frecuente de lo que se pensó (225). En este sentido, otros autores identificaron su excreción a través de la saliva de individuos seropositivos al VIH sin SK y algunos detectaron su ADN en saliva y CMSP de HSH seropositivos al VIH y al HVH-8 (255, 262). Asimismo, se comprobó que puede excretarse en unión a otros HVs (CMV, HSV-1 y VEB) a través de la saliva de individuos seropositivos al VIH sin SK, incluso mediante la saliva de pacientes con enfermedades hematológicas malignas (93, 263). Es más, su genoma se detectó en CMSP de adultos seronegativos al VIH residentes en zonas de elevada prevalencia de infección del HVH-8 en ausencia de signos clínicos de SK (264).

Uno de los hallazgos interesantes del presente estudio, lo constituye la detección del genoma del HVH-8 en más de 2 muestras clínicas diferentes de pacientes con SK-SIDA (67.3%) y en contactos asintomáticos (59.1%). Hasta el momento, sólo se había señalado por algunos autores que durante la oncogénesis del SK la infección viral sistémica podría jugar un papel importante,



basándose en los hallazgos de algunos estudios en los que se analizaron de forma simultánea por medio de PCR: muestras de lesiones tumorales y CMSP, muestras de suero y saliva de pacientes con SK (265-267). Por tanto, los resultados obtenidos demuestran la validez de esta hipótesis y se confirma la presencia del virus en diferentes compartimentos de un mismo individuo con o sin diagnóstico de SK-SIDA.

IV.2.1.1. Carga viral del HVH-8 en pacientes con SK-SIDA

Cuando se comparó la media de la CV del HVH-8 entre las muestras de plasma, saliva, CMSP y tejido se encontraron valores significativamente superiores en este último compartimento ($p < 0.05$) y aunque la CV que se detectó en las muestras de saliva fue superior a la encontrada en CMSP, la diferencia no fue significativa (Figura IV.7). No obstante, los valores de CV que se encontraron en saliva y CMSP fueron superiores a los que se determinaron en las muestras de plasma ($p < 0.05$). Estas diferencias traducen la existencia de un grado variable de replicación del HVH-8 en diferentes células y fluidos orgánicos.

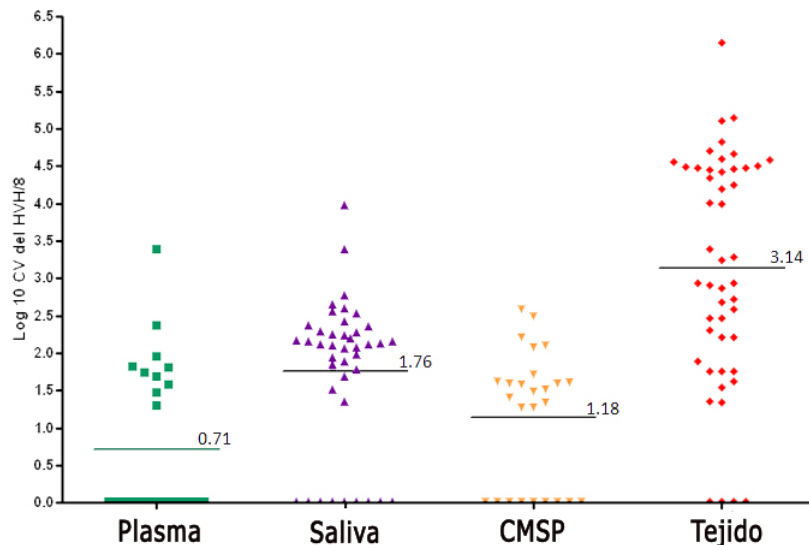


Figura IV.7. Logaritmo de la CV del HVH-8 detectada por qRT-PCR en muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA.

Inicialmente algunos autores detectaron el ADN del HVH-8 en la piel normal de individuos con SK-SIDA (268, 269) pero luego se reconoció que la CV en el sitio de la lesión es mayor (270, 271). Se estima que por cada célula fusiforme hay de 1 a 5 copias del genoma de este radinovirus humano (272), lo que conlleva al mantenimiento eficiente y propagación del ADN episomal durante la división y migración de las células endoteliales (273). En los pacientes coinfectados por HVH-8 y VIH se incrementa tanto la incidencia del SK-SIDA como su agresividad con tendencia a diseminación hacia órganos internos (274). Mediante estudios *in vitro* se encontró que ambos patógenos establecen interacciones moleculares entre sí que repercuten en su replicación (275).



Así se reconoció que la proteína *Tat* del VIH induce la replicación del HVH-8 y estimula la proliferación de células fusiformes, en las que también inhibe la apoptosis (276, 277). A este efecto se añade la estimulación en la producción de citoquinas inflamatorias y el deterioro de la respuesta inmune del hospedero inducida por el VIH (278, 279). Por tanto, estos mecanismos crearían las condiciones necesarias que favorecen la replicación del HVH-8 en el sitio del tumor, lo que se traduce en el número de copias significativamente superior que se detectó en las muestras de tejidos de los pacientes con SK-SIDA. Es más, Pak y colaboradores encontraron que la CV en del HVH-8 en las lesiones del SK-SIDA es superior a la que se detecta en lesiones de otras variantes clínicas del SK (280).

Al comparar la CV del HVH-8 entre tejidos embebidos en parafina con la que se detectó en tejidos frescos, se encontró que el número de copias en los últimos fue significativamente superior ($p = 0.003$). Este hallazgo no se había reportado previamente en estudios relacionados con el HVH-8. Algunos autores aceptan que el tejido almacenado en congelación, aún por largos períodos, es el material idóneo para conservar el ADN (281, 282). Otros autores comprobaron que durante la conservación del tejido embebido en parafina se puede producir una degradación masiva del ADN, quizás por la progresiva acidificación de la formalina en ácido fórmico (283-285). Es por ello que según los resultados obtenidos sugerimos emplear muestras de tejido fresco para determinar la CV del HVH-8 por qRT-PCR. Hammock y colaboradores publicaron resultados similares (286) y quizás esta sea la razón por la que Bezold y colaboradores concluyeron que la CV del HVH-8 es baja en las lesiones de SK embebidas en parafina (287).

A pesar de los avances producidos en el estudio de la infección por el HVH-8 no se ha definido la patogenia de su infección y aún existen puntos de vistas discordantes. Se acepta que después que un individuo desarrolla Acs contra el HVH-8 (seroconversión) su infección persiste durante toda la vida, etapa en la que alternan ciclos de replicación lítica con períodos de latencia viral (288). Sin embargo, no se han identificado ni los mecanismos que regulan la latencia ni los factores que detonan su replicación activa. Tampoco se ha comprobado si el estado latente en el que se encuentra el HVH-8 en las células fusiformes persiste durante un período indefinido, o si el virus necesita reinfectar nuevas células endoteliales de forma continua para persistir por períodos indefinidos (289).

Varios autores aceptan que los genes virales que se expresan durante el ciclo replicativo lítico contribuyen a la patogenia del SK, favorecen el mantenimiento y la progresión del tumor (290-292). Esta hipótesis se formuló en base a varios mecanismos. Uno de ellos se relaciona con la ineficiente retención del genoma latente viral (episoma) en las células en división (no linfocitos B)



(290). Así se postuló que el HVH-8 *in vivo* necesita reinfectar de forma periódica a células endoteliales para persistir en el hospedero (289). También se señaló que *in vitro* los inhibidores de la ADN polimerasa inducen una reducción en la producción de partículas virales (293). La replicación lítica a nivel de la lesión podría entonces promover la infección de los linfocitos B y de nuevas células endoteliales con lo que se produce el incremento de la CV del HVH-8 y se favorece la progresión del tumor (294). Interesantemente, se identificó que las células de las lesiones del SK y del LEP corresponden con la expansión monoclonal de una célula infectada. Esto permitió afirmar que la infección por el HVH-8 antecede al desarrollo del tumor y por tanto apoya la presencia del genoma viral en estado latente durante la proliferación de la célula transformada (295).

Esta hipótesis se comprobó posteriormente por Asahi-Ozaki y colaboradores en el 2006, quienes encontraron que la CV del HVH-8 fue mayor en las células endoteliales de estadíos iniciales (272). De esta forma el HVH-8 es capaz de inducir el crecimiento anormal de estas células que produce el engrosamiento de los vasos sanguíneos. Otros autores detectaron ARNm de Ags líticos en el 1% de las células tumorales (291, 296-299) y afirmaron que existe variabilidad en su expresión entre individuos, incluso entre los estadíos del SK. Los ARNm líticos se correlacionan con la fracción de células infectadas que inician un ciclo lítico de replicación del HVH-8. El hecho de que se hayan detectado traduce la existencia de un número de células en el tumor que soportan la infección lítica de este HVs, por lo que la CV sería significativamente mayor.

Sería válido señalar que las investigaciones iniciales en las que se planteó que la detección del ADN del HVH-8 en las células infectadas se corresponde con la amplificación del genoma latente emplearon protocolos cualitativos de PCR. En dichos estudios se emplearon muestras de tejido embebidas en parafina almacenadas por períodos prolongados de tiempo. Los resultados del presente estudio demuestran la limitación inherente a esta forma de conservación del tejido. Entonces se hace necesario reevaluar el uso de la CV del HVH-8 en el diagnóstico y monitoreo de la infección por este agente en muestras de tejido fresco almacenadas en congelación. En los estudios de la infección por otros HVs en diferentes grupos de riesgo se ha demostrado el valor de la CV en la diferenciación entre una infección latente de una lítica (241, 300, 301).

En estudios posteriores se identificó que las células progenitoras endoteliales de estadíos tardíos (late-EPCs: siglas del inglés *Late endothelial progenitor cells*) aisladas de las CMSP de individuos con SK clásico fueron capaces de soportar la infección lítica del HVH-8 por lo que se considera que constituyen un importante reservorio de este agente (140). Estas células contribuyen de manera directa con la neovascularización (302-304), derivan de la fracción CD14⁺ de las CMSP y



son capaces de formar capilares *in vitro*. Se piensa que constituyen la principal fuente de las células progenitoras endoteliales *in vivo* (305-309). A través del qRT-PCR se demostró que la CV del HVH-8 es alta en el sobrenadante del cultivo de estas células en ausencia de estimulación, lo que indica que soportan la replicación lítica del HVH-8 y que éste a su vez se propaga en el cultivo por ciclos repetitivos de infección *de novo* (140). Estudios pioneros como estos son de crucial importancia para la comprensión de la patogenia de la infección por el HVH-8, quizás contribuyan a reevaluar algunos conceptos que actualmente encuentran a su paso hechos que los contradicen, además reafirman la ocurrencia de la infección lítica del HVH-8 que se enunciara anteriormente.

En concordancia con los resultados obtenidos en la presente investigación, otros autores identificaron el ADN del HVH-8 en muestras de saliva de pacientes con cualquiera de las variantes clínico-epidemiológicas del SK (310-312); incluso con valores elevados de CV (100, 311). Con ello se sugiere que este fluido constituye la principal vía por la que se transmite este virus a un hospedero susceptible, como sucede en el resto de los HVs (93). No obstante, todavía no se ha podido dilucidar el modo en el que tiene lugar este evento. En la presente investigación se reconoce que los pacientes cubanos con SK-SIDA representan un importante reservorio del HVH-8 en nuestro medio. Esto pudiera guardar relación con el porcentaje de infección que se encontró en los contactos de estos pacientes y quizás con el incremento del número de casos del SK en población VIH (313). No obstante, en futuras investigaciones habría que evaluar su posible impacto en la transmisión a individuos inmunocompetentes. Especialmente si otros autores han llegado a identificar partículas infectivas de este agente en la saliva (314) y se ha logrado su aislamiento en líneas de linfocitos B a partir de este fluido (315).

Los valores de CV del HVH-8 que se detectaron en CMSP de pacientes con SK-SIDA pudieran traducir variaciones en la estrategia replicativa que este virus emplea en diferentes sitios anatómicos (tejido vs CMSP; plasma vs CMSP; saliva vs CMSP; etc). Los valores de CV en CMSP contrastan con los detectados en el sitio de la lesión, en el que existe un alto grado de proliferación de células endoteliales. Ello permitiría sugerir que el HVH-8 circula en CMSP en forma latente (256, 316) y justificaría el hecho de que en estas células la CV sea mayor a la que se detectó en el plasma de los pacientes con SK-SIDA (258). Sin embargo, los hallazgos hasta el momento son controversiales y se desconoce si el ADN del HVH-8 que se detecta en CMSP es resultado de la reactivación y replicación del virus, o si corresponde con la expansión de las células B latentemente infectadas (288, 317).



Varias hipótesis se elaboraron con vistas a explicar las diferencias encontradas entre estudios que han determinado la CV del HVH-8 en plasma. El primer aspecto a tener en cuenta es el escaso número de estudios, pues en la mayoría se cuantifica el genoma de este HVs en CMSP (318). Algunos autores detectaron su ADN de forma intermitente en plasma (319), mientras que otros reportaron que esto sucede sólo cuando la CV en CMSP era alta (256). Es válido reconocer que en otras infecciones por agentes virales se considera la CV en plasma o suero como la mejor vía para estimar el progreso de la infección (320-322). Sin embargo, en la infección por el HVH-8 no parece ser así. La CV del HVH-8 en el plasma siempre se ha determinado después del diagnóstico del SK ó en pacientes bajo tratamiento, por medio de diferentes técnicas (256). Es por ello que, en concordancia con otros autores (318), se considera que no se puede llegar a conclusiones categóricas sobre la presencia del HVH-8 en plasma, ni acerca del papel que juega este fluido en la patogenia de la infección antes de la formación del tumor.

Las diferencias que se encontraron en los valores de CV del HVH-8 entre diferentes muestras clínicas demuestran que existen diferencias en su estrategia replicativa en sitios anatómicos distantes. Asimismo, debido a los hallazgos en la frecuencia de detección del ADN del HVH-8 entre ellas, se reconoce que cualquiera de las muestras estudiada es útil para saber si un individuo está infectado o no por este HVs. No obstante, si no se puede identificar su ADN en el tejido se deberán analizar al menos dos muestras clínicas en momentos diferentes, preferentemente CMSP y saliva. Esto guarda relación con los reportes que se comentaron anteriormente en los que se evidenció su excreción intermitente en fluidos orgánicos.

IV.2.1.2. Carga viral del HVH-8 en contactos sin evidencias clínicas de SK

Antes de iniciar el análisis de este acápite es importante destacar que no se han publicado previamente estudios de contactos de pacientes con SK-SIDA con los que se pueda comparar los resultados obtenidos en la presente investigación. Este estudio representa el primer estudio a nivel internacional en el que se evalúa por qRT-PCR de manera simultánea la frecuencia de detección y CV del ADN del HVH-8 en diferentes muestras clínicas de contactos de pacientes con SK-SIDA.

Al comparar la CV del HVH-8 que se detectó en las muestras estudiadas se encontró que el valor medio de la CV en saliva y CMSP fue significativamente superior al que se encontró en plasma ($p < 0.05$). Por otra parte, aunque se reconoció que la CV del HVH-8 en las muestras de saliva fue mayor que en CMSP, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) (Figura IV.8). Casper y colaboradores detectaron excreción intermitente del HVH-8 con altos valores de CV en la saliva



de HSH seronegativos al VIH en ausencia de signos clínicos de SK (323). Del mismo modo, Pauk y colaboradores reportaron que la CV del HVH-8 en la cavidad oral de HSH fue 2.5 veces mayor a la que detectaron en otros sitios mucosos, incluso identificaron la presencia de ARNm del HVH-8 en células del epitelio oral (225). Este hallazgo reafirma la hipótesis de que el HVH-8 produce una infección activa a nivel de la orofaringe con lo que se favorece su excreción a través de la saliva hacia un hospedero susceptible en ausencia de signos de enfermedad.

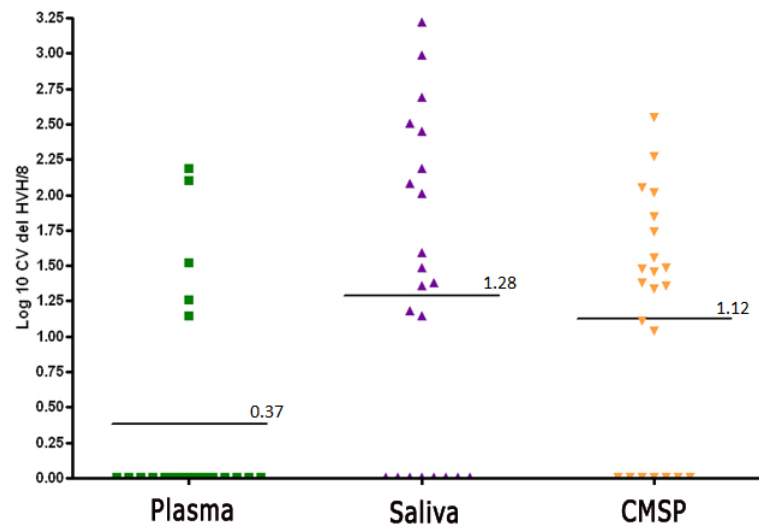


Figura IV.8. Logaritmo de la CV del HVH-8 detectada por qRT-PCR en muestras clínicas de individuos sin evidencias clínicas de SK, contactos de pacientes con SK-SIDA.

Llama la atención que el genoma del HVH-8 se detectó en más de una muestra clínica de dos de los tres contactos intradomiciliarios incluidos en la presente investigación (**Caso 1:** Plasma: 126 copias/ μ L; Saliva: 15 copias/100ng de ADN y CMSP: 70 copias/100ng de ADN; **Caso 2:** Plasma: ndt; Saliva: 154 copias/100ng de ADN; CMSP: 22 copias/100ng de ADN). Esta constituye la primera evidencia de que en Cuba la transmisión horizontal del HVH-8 puede ocurrir entre individuos de una misma familia. Estudios previos sugirieron que Cuba podría representar una zona de prevalencia intermedia de la infección por HVH-8. En ese estudio no se encontraron evidencias de que la transmisión sexual fuera la vía por la que este agente había infectado a los individuos estudiados (324). Entonces la explicación más lógica para explicar esos hallazgos sería la transmisión de este HVs mediante la saliva. No obstante, Kourí y colaboradores al estudiar un reducido número de donantes de sangre cubanos encontraron una baja prevalencia de infección por HVH-8 (1.2%) (313). Entonces, será necesario realizar un estudio de seroprevalencia en población general para conocer el impacto real de la infección por este agente en Cuba.

Todo lo anterior cobra mayor relevancia si existen antecedentes de la presencia del HVH-8 en población general antes del inicio de la epidemia del VIH, cuando autores cubanos reportaron



cuatro casos de SK en el año 1981 (325). Además, se alertó sobre la identificación del ADN del HVH-8 en lesiones de SK de dos individuos seronegativos al VIH que refirieron no haber salido del país (326). A lo que se agrega, el primer reporte de caso de SK iatrogénico, del que se tenga conocimiento, en paciente cubano receptor del trasplante renal en el año 2004 (327). Entonces, sería obligatorio definir las posibles vías de transmisión del HVH-8 en Cuba.

Hasta el momento, la transmisión horizontal del HVH-8 sólo se ha descrito en zonas donde el SK es endémico. En este sentido, mediante estudios de epidemiología molecular se demostró que los integrantes de la familia y otros contactos extrafamiliares constituyeron la fuente de infección de niños en Malawi, África (328). También se sugirió en otras regiones debido a la seroprevalencia de Acs anti-HVH-8 que se encontró en población pediátrica residente en la antigua Yugoslavia, África Central y en tribus aisladas del Amazonas en Brasil (329-331). Otros autores consideraron esta vía de transmisión al analizar la frecuencia de Acs anti-HVH-8 en población general (332). Así se ha llegado a suponer que existen factores genéticos, no identificados aún, que predisponen a determinados integrantes de una misma familia para desarrollar un SK (333).

Otro hallazgo interesante del presente estudio fue encontrar que dos de los tres individuos que eran parejas serodiscordantes de pacientes con SK-SIDA, estaban infectados por el HVH-8. En ellos el genoma del virus se amplificó en las tres muestras clínicas analizadas (**Caso 1** Mujer: Plasma: 14 copias/ μ L; Saliva: 39 copias/100ng de ADN y CMSP: 113 copias/100ng de ADN; **Caso 2** HSH: Plasma: 18 copias/ μ L; Saliva: 121 copias/100ng de ADN; CMSP: 30 copias/100ng de ADN). Estos resultados obligan a replantear la hipótesis en la que se consideró al HVH-8 como patógeno de transmisión sexual. Casper y colaboradores encontraron que la seroprevalencia del HVH-8 entre parejas serodiscordantes de HSH se asoció con antecedentes de contacto con individuos seropositivos al VIH o parejas desconocidas. Llegaron incluso a involucrar a la orofaringe como el sitio anatómico a través del cual adquirieron este HVs (334). En concordancia con otros autores (335), los resultados del presente estudio sugieren que en caso de que este virus oncogénico se transmita por la vía sexual, esta se deberá producir y mantener a través de otras prácticas no reconocidas clásicamente como conducta sexual de riesgo.

IV.2.2. Relación de la CV del HVH8 en individuos con SK-SIDA y sus contactos, con las variables clínico, epidemiológicas e histopatológicas

Los principales mecanismos de replicación del HVH-8 que se han identificado hasta el momento se reconocieron a través de estudios con líneas celulares derivadas de LEP. Aunque esos estudios han sido convenientes e informativos, se conoce que esta patología no es una forma común de evolucionar la infección por el HVH-8. A lo que se suman diferencias biológicas entre el



virus que infecta a los individuos que nunca evolucionan hacia el LEP y las características del virus cultivado *in vitro* (258). Por tanto, en el presente estudio se decidió correlacionar los valores de CV del HVH-8 en las muestras clínicas estudiadas con algunas variables que pudieran estar relacionadas con su infección y el desarrollo del SK en Cuba.

De esta forma se comprobó que el genoma del HVH-8 se puede detectar en varias muestras de pacientes con SK-SIDA y sus contactos, aunque no es frecuente su amplificación en plasma. No se encontraron diferencias significativas entre la CV de muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y los contactos (plasma: $p = 0.20$; saliva: $p = 0.31$; CMSP: $p = 0.93$) (Figura IV.9). Entonces, se reconoce que aunque este radinovirus es una condición necesaria para el desarrollo del SK, no es suficiente. No obstante, como el presente estudio representa un corte transversal no se puede definir cuál de estos contactos desarrollará el SK y cuál no. Su seguimiento en futuras investigaciones aportará nuevas evidencias sobre la patogenia de la infección por este agente.

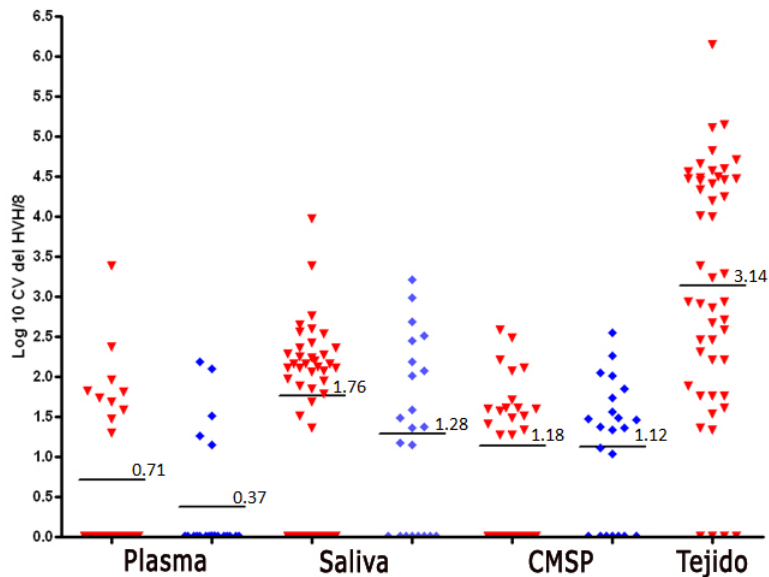


Figura IV.9. Logaritmo de la CV del HVH-8 detectada mediante qRT-PCR en muestras clínicas de pacientes con SK-SIDA y sus contactos.

En el presente estudio fue más frecuente encontrar el genoma del HVH-8 en muestras de tejido de pacientes con SK-SIDA de origen caucásico que aquellos mestizos o negros ($p = 0.006$). No existen reportes previos de esta asociación, aunque otros autores habían observado, desde el punto de vista clínico, que el SK era más frecuente entre individuos de piel blanca (336-338). Desde el descubrimiento del HVH-8 se sugirió la influencia de factores genéticos y/o ambientales para explicar la distribución geográfica irregular de este virus y la predisposición a su infección entre miembros de una misma familia (330, 339). Dichos factores podrían predisponer a la infección por este virus, aumentar su replicación e inducir el desarrollo del SK (340). En



concordancia con otros investigadores (93, 323), no se encontró relación entre la CV del HVH-8 y la edad. Otros autores han descartado el efecto del sexo, el que junto con la edad no explica las diferencias geográficas que existen en los patrones de su infección (341). Sin embargo, varios autores han identificado ciertos haplotipos que predisponen a la infección por el HVH-8 (333, 342-344), asociándose algunos con mayor excreción de este HVs en la saliva (100).

Por otra parte, se identificó que existió asociación significativa ($p = 0.009$) entre la conducta homosexual y la CV en el tejido de pacientes con SK-SIDA. Fue tres veces más frecuente que los HSH desarrollen un SK con alta CV al HVH-8 en el tejido (OR: 3, IC= 1.1-12.5). Igualmente, fue más frecuente detectar el ADN del HVH-8 en muestras de saliva y CMSP de HSH contactos de pacientes con SK-SIDA ($p = 0.014$), identificándose mayor riesgo de excreción del HVH-8 en la saliva de HSH (OR= 4.33; 1.117-16.8), no así con la positividad del HVH-8 en las CMSP.

Se acepta que las relaciones sexuales entre HSH seropositivos al VIH constituyen una vía importante para la transmisión del HVH-8 en regiones de baja prevalencia de infección. En ellos, la enfermedad es 300 veces más frecuente que en otros individuos inmunodeprimidos (345). Su elevada susceptibilidad se ha justificado con el uso de determinadas técnicas sexuales, no identificadas aún, que al parecer favorecen la adquisición del virus. Si el intercambio de fluidos interviene en la transmisión del HVH-8, entonces no se comprende la baja frecuencia de infección entre individuos HT (341). De esta forma se han denunciado como mecanismos favorecedores de la infección por este virus oncogénico: la intensidad en el intercambio de saliva, el número de parejas con las que se intercambian besos (tiempo y frecuencia de estas prácticas), el uso de la saliva en la lubricación y el tipo de contacto sexual (anal, oral, ano-oral u oral-genital) (24, 346).

Otros autores han reportado la asociación entre la excreción del HVH-8 en la saliva con la conducta homosexual de HSH seropositivos al VIH (347). Sin embargo, en Cuba no se había identificado esta asociación hasta el momento. En estudios previos realizados en población general cubana no se encontró correlación entre el comportamiento sexual y la infección por este HVs (313, 324). Los resultados que se muestran en la presente investigación destacan que el contacto con la saliva de los HSH pudiera constituir un riesgo de adquisición del HVH-8 entre ellos. Por tanto, se hace necesario identificar las prácticas homosexuales que condicionan el paso del virus de un hospedero a otro.

Actualmente el mayor reto es explorar las características específicas del acto sexual en sí, precisando si el contacto es anal, oral, ano-oral u oral-genital, para definir su importancia en la transmisión del HVH-8 (24, 346, 348). No obstante, si la saliva es la vía principal de transmisión del HVH-8, habría que definir el por qué de la baja prevalencia de infección en individuos HT



(334). Aunque los resultados del presente estudio demuestran que estos individuos no están exentos de adquirir este virus oncogénico, pues dos de los seis individuos HT resultaron estar infectados. Lo cierto es que todavía no se ha podido definir el modo de adquisición, el sitio anatómico de la mucosa genital o anal que alberga al virus y las prácticas sexuales seguras que evitarían su transmisión (23). El comportamiento sexual de riesgo que hasta ahora se ha tratado de asociar con la seropositividad al HVH-8 incluye la tenencia de varias parejas sexuales, el contacto con individuos con SK, las relaciones sexuales con individuos seropositivos al VIH, así como la historia previa de ITS (349, 350).

Por otra parte, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre los estadios histológicos del SK-SIDA y la CV del HVH-8 en ninguna de las muestras clínicas estudiadas. Hasta ahora, los resultados en este aspecto son contradictorios. Algunos autores no encuentran asociación entre estas variables (267, 351, 352), mientras que otros obtienen resultados diferentes (32, 353, 354). Se plantea por algunos que la CV del HVH-8 en CMSP se correlaciona con el grado de inmunodepresión y la progresión de la enfermedad en pacientes con SK-SIDA y SK latrogénico, por lo que su presencia en CMSP puede considerarse un parámetro predictivo del SK (355, 356). Por el contrario, otros no reconocen que existen diferencias en la CV del HVH-8 en CMSP entre diferentes estadios de pacientes con SK Clásico (351). Finalmente, no existen argumentos contundentes que permitan aceptar o rechazar alguna de estas hipótesis. Por cierto, la detección del ADN del HVH-8 en CMSP en individuos seropositivos sin evidencias de enfermedad complica aún más la interpretación de muchos de los resultados que hasta el momento se consideraban válidos (357, 358).

El conteo de linfocitos T CD4+ se comparó tanto con el porcentaje de casos positivos al HVH-8, como con el número de copias del ADN del HVH-8 en las muestras clínicas estudiadas. Incluso entre los individuos con SK-SIDA y entre los contactos seropositivos al VIH-1. No se encontró relación entre la CV al HVH-8 y el conteo de linfocitos T CD4+ en ninguno de los grupos ($p > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos y la CV del VIH y la del HVH-8. Dichos resultados indican que, independientemente del estado inmunológico del hospedero, el ADN del HVH-8 se puede detectar en individuos infectados por este HVs. El hecho de no encontrar relación entre la CV del HVH-8 entre contactos seropositivos al VIH o seronegativos refuerza lo planteado anteriormente ($p > 0.05$).

Hallazgos similares fueron documentados por otros (347, 357) y desde los inicios de la epidemia del SIDA se reconoció que la media del conteo de linfocitos T CD4+ en el SK era superior al que aparecía en otras EO (359). No obstante, se acepta que el conteo de linfocitos T CD4+ menor de



200 células/mL y la alta CV del VIH (> 10 000 copias/μL) constituyen indicadores del grado de inmunosupresión y de la elevada replicación viral relacionadas con la infección por el VIH. Algunos autores señalan que pueden predecir el desarrollo del SK (345, 360). Sin embargo, Nasti y colaboradores comprobaron que el conteo de linfocitos T CD4+ no parece influir en el pronóstico del SK (361). Por otro lado, el IRIS también se ha descrito con cierta frecuencia en individuos seropositivos al VIH-1 en los que la mejoría del conteo de linfocitos T CD4+ y la disminución de la CV del VIH no influyen en la progresión del SK ni en la infección por HVH-8 (274, 362, 363). Aún más, tras la introducción de la TARVAE en el manejo de estos pacientes se ha encontrado que la CV del HVH-8 en CMSP no se relaciona con el conteo de linfocitos T CD4+ (364).

Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que existen otros efectores de la respuesta inmune celular involucrados en la patogenia de la infección por el HVH-8. No existen publicaciones previas de autores cubanos en las que se evalúen los mediadores de la respuesta inmune tras la infección por el HVH-8 y su repercusión en la evolución de pacientes con SK-SIDA. Los resultados que se muestran abren nuevos horizontes sobre la posible existencia de cofactores que pueden repercutir en la patogenia del SK en Cuba.

IV.3. Infección por HVs linfotropos en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico

El Síndrome Adénico no es una enfermedad de declaración obligatoria, por lo que su incidencia permanece en la incógnita. Recientemente, Richner y Laifer estimaron que puede aparecer en cerca del 1% de los adultos inmunocompetentes (10). En otros países, su frecuencia en la atención primaria es baja (0.4%-4%) si se compara con la que reportan algunas clínicas especializadas. En estas últimas la incidencia oscila entre el 17% y el 60%, con incremento de su asociación con enfermedades malignas (365).

Durante el período 2009-2010, el Síndrome Adénico en individuos seropositivos al VIH-1 apareció con mayor frecuencia en pacientes del sexo masculino, de piel blanca con edad promedio de 34.4 años. A pesar de que la media del conteo de linfocitos T CD4+ superó las 200 células el 31.3% de los pacientes estudiados presentó valores inferiores a las 200 células. El 71.7% de los pacientes tenía valores de CV del VIH-1 por debajo de las 55 000 copias (Tabla IV.7).



Tabla IV.7. Principales características clínicas y datos demográficos de pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico (2009-2010).

Variables		Adultos VIH+	
Media edad		34.4 años (Rango 17-56)	
Sexo	Femenino	5	10.2%
	Masculino	44	89.8%
Color de la piel	Blanco	34	69.4%
	Negro	6	12.2%
	Mestizo	9	18.4%
Debut sida	Sí	17	34.7%
	No	32	65.3%
Media del Conteo de Linfocitos T CD4+* (cél/mm ³)		310 Rango: 16-772	
Conteo de CD4 * células/mm ³	<200	15	31.3%
	200-499	26	54.2%
	>500	7	14.6%
Media de CV del VIH** (copias/mL)		61 101 Rango: ndt- 528 735	
CV del VIH **	<55 000	33	71.7%
	>55 000	13	28.3%

* Dato no disponible en HC de 1 paciente

** Datos no disponibles en HC de 3 pacientes

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK

El análisis histopatológico de las muestras de ganglios linfáticos de los pacientes incluidos en el presente estudio mostró que los linfomas (LH y LNH) fueron la principal causa del Síndrome Adénico. En orden de frecuencia le siguieron la linfadenitis reactiva (LR) y la linfadenitis granulomatosa (LG). También se diagnosticaron casos en los que el SK en el ganglio linfático fue la causa del Síndrome Adénico y finalmente en otros se describió una hiperplasia linfoide y transformación vascular (HLTV) en el informe de la biopsia (Figura IV.10).

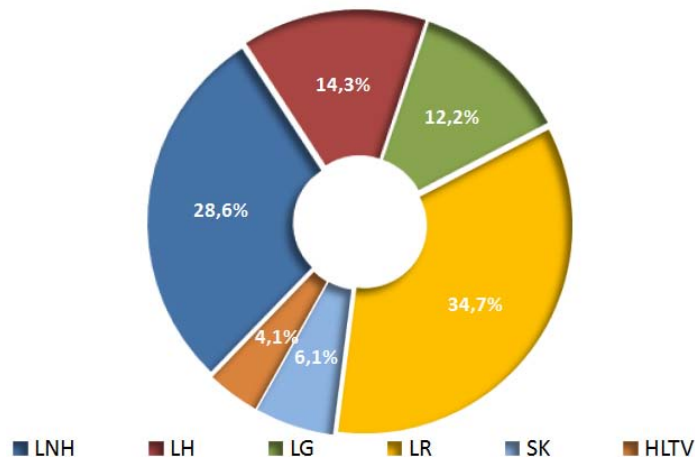


Figura IV.10. Patologías detectadas en fragmentos de ganglios linfáticos de pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico según diagnóstico histopatológico (2009-2010).



A pesar de los notables avances en el diagnóstico y tratamiento de los linfomas, estos representan una causa importante de mortalidad asociada a cáncer. En el 2010 los LNH fueron la sexta causa más común de cáncer entre hombres y mujeres residentes en los EUA (366). Las cifras que se reportaron en Europa en el 2006 fueron superiores, incluso con elevada mortalidad (367). No obstante, se reconoce que en comparación con la población general los individuos seropositivos al VIH-1 poseen entre 60 a 200 veces y de 8 a 10 veces más riesgo de desarrollar un LNH y LH, respectivamente (368, 369). Así se ha observado en varios países un incremento en la frecuencia de los LNH en este grupo poblacional tras la introducción de la TARVAE, aunque la asociación entre esta enfermedad y la infección por el VIH no se ha dilucidado aún (370-372). Por el contrario, otros reconocen que la incidencia del LH ha disminuido, mejorando incluso la sobrevida de estos pacientes (373).

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2008 (374), los subtipos de LH que se identificaron en los pacientes estudiados en la presente investigación fueron: esclerosis nodular (1 paciente) y celularidad mixta (6 pacientes). No se diagnosticaron subtipos con depleción linfocítica (LD siglas del inglés *Lymphocyte-depleted*) ni subtipos ricos en linfocitos (LR siglas del inglés *Lymphocyte-rich*). Mediante IHQ se confirmó el diagnóstico de proceso linfoproliferativo en el 100% de los pacientes con LNH a través de la inmunolocalización del CD45 en el ganglio linfático (Tabla IV.8).

Tabla IV.8. Resultados de la inmunohistoquímica del ganglio linfático de pacientes seropositivos al VIH con diagnóstico histopatológico de LNH (2009-2010).

Marcadores	Positivos		Negativo	
	No.	%	No.	%
CD45	14	100	-	-
CD20	13	92.9	1	7.1
CD30	1	7.1	13	92.9
CD3	1	7.1	13	92.9
LMP-1	3	25	9	75
Ki 67	<80%	5	35.7	-
	>80%	9	64.3	-

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK

Por otra parte, el 92.9% de los LNH que se diagnosticaron en el presente estudio fueron de estirpe B (CD20+), sólo en un paciente se identificó un LNH de células T (7.1%) (CD3+ CD20-). Entre los linfomas de células B fueron más frecuentes los subtipos de alto grado de malignidad. Se diagnosticó un LNH de células grandes difuso en el 92.3% de los pacientes estudiados, de ellos el 58.3% fue de la variedad Inmunoblástica (IB). Sólo se identificó un paciente que presentó un LNH de bajo grado de malignidad (LNH plasmocitoma: 7.7%). De forma general,



los Acs nucleares Ki-67 se encontraron en 9/14 pacientes estudiados en más del 80% de las células tumorales, lo que traduce alto grado de proliferación tumoral. Estos resultados coinciden con el reporte previo de Miralles y colaboradores quienes describieron un predominio de LNH de células grandes difusas en población cubana seropositiva al VIH-1 durante el período 2004 - 2005 (375).

En los pacientes con LNH que se diagnosticaron en la presente investigación sólo se trató de localizar en el ganglio la proteína LMP-1 del VEB, por no contar con Acs monoclonales contra el resto de las proteínas que expresa el virus durante su ciclo de vida. La LMP-1 sólo se identificó en el 30% de los pacientes con LNH (Tabla IV.8). Resultados similares fueron publicados por otros autores que evaluaron su expresión en el ganglio de pacientes con LNH (376, 377), o incluso con porcentajes inferiores en pacientes con linfadenopatías reactivas (378). Es por ello que algunos autores recomiendan incluir varios Acs contra Acs líticos y latentes del VEB en la inmunohistoquímica para lograr una mejor interpretación de los resultados y así caracterizar de forma correcta las células tumorales (VEB positivos o VEB negativos) (379). Actualmente, se recomienda por algunos autores el uso de hibridación *in situ* para identificar ARN codificados por el VEB (EBERs siglas del inglés *Epstein-Barr virus-encoded RNA*) en el tejido tumoral basándose en la sensibilidad diagnóstica alcanzada con esta técnica (380).

De forma general los síntomas más frecuentes fueron la fiebre (43.8%), la astenia (20.8%) y la sudoración nocturna (6.3%). El aumento de volumen localizado (75.5%) fue el signo clínico más común, ubicado específicamente en la región cervical (53.1%). El 45.7% de los pacientes con Síndrome Adénico presentó visceromegalia. Entre los órganos aumentados de tamaño se identificó al hígado (19.6%) y al bazo (6.5%), incluso el 19.6% de los pacientes presentaron hepatoesplenomegalia. En el anexo 10 se muestran las principales características clínicas del Síndrome Adénico que presentaron los pacientes incluidos en la presente investigación según su diagnóstico histopatológico.

IV.3.1. Prevalencia de Acs contra VEB, CMV y HVH-6 en pacientes seropositivos al VIH-1 con diagnóstico de Síndrome Adénico

En la presente investigación se conoció que el 100% de los individuos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico tenían una infección latente por CMVh (IgG anti-CMV: positivo). No se identificó IgM anti-CMV en el suero de ningún paciente. Del mismo modo se encontró que el 97.9% de ellos estaba infectados por el HVH-6 (IgG anti-HVH-6: positivo). Asimismo, se detectó que el VEB en el 80% de los pacientes estaba en estado latente. La infección primaria y reactivación del VEB se encontró en el 4.4% y el 15.6% de los pacientes, respectivamente.



Los HVs linfotropos son patógenos ubicuos que infectan a gran parte de la población a escala mundial (CMV: 50-70%; VEB, HVH-6 y HVH-7: $\geq 90\%$) a excepción del HVH-8 cuyos valores de seropositividad en población adulta de países no endémicos es inferior al 35% (381-383). En el hospedero inmunocompetente la infección primaria suele ser asintomática o con síntomas inespecíficos banales y la reactivación viral habitualmente se produce sin evidencias clínicas. Por el contrario, en los individuos seropositivos al VIH-1 la reactivación de alguno de los HVs tiende a causar enfermedad. Además, existen reportes en los que se demuestra que la seroprevalencia de HVs linfotropos en individuos seropositivos al VIH-1 es superior a la encontrada en población general (154, 384), aunque existen variaciones en la frecuencia que se reporta entre las diferentes cohortes (385-387).

IV.3.2. CV de HVs linfotropos en el ganglio linfático y la saliva en el manejo del Síndrome Adénico de pacientes seropositivos al VIH-1

En el presente estudio se encontró ADN de al menos un HVs linfotropo en el ganglio linfático del 98% de los pacientes con Síndrome Adénico. El 87.5% de ellos excretó algún HVs a través de la saliva. Mediante qRT-PCR se identificó que el HVs linfotropo más frecuente en el tejido linfoide y saliva de estos pacientes fue el VEB (Figura IV.12). En cambio, la frecuencia del resto de los agentes varió en ambos compartimentos. En el ganglio linfático se encontró que tras el VEB fueron comunes las coinfecciones por HVs, el HVH-6 y el HVH-8; identificándose el genoma del CMVh sólo en un paciente (2%). Por el contrario, en las muestras de saliva, en orden de frecuencia, a la excreción del VEB le siguió la coinfección por HVs y el CMVh.

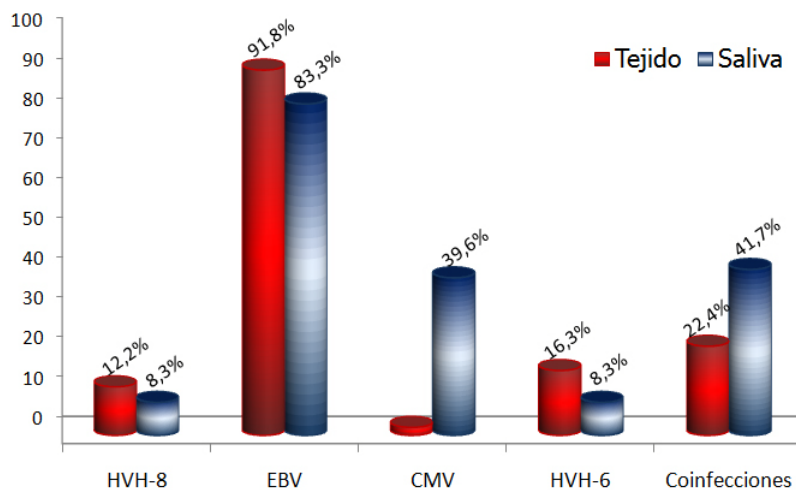


Figura IV.12. Frecuencia de detección de HVs linfotropos mediante qRT-PCR en fragmentos de ganglios linfáticos y saliva de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico (2009-2010).

Hasta el momento no existen reportes en los que se analice el Síndrome Adénico en este grupo poblacional con un enfoque integrador, como tampoco se ha determinado la frecuencia con que



estos agentes se relacionan con esta entidad clínica. Por tanto, no existen referencias disponibles con las que se puedan comparar los resultados obtenidos en el presente estudio. Incluso, cuando se ha estudiado de forma individual la asociación de algunos de los HVs linfotropos con algunas de las patologías que se identifican en el ganglio linfático se reporta variabilidad en su frecuencia. Esto pudiera relacionarse con las diferencias en los diseños experimentales, los pacientes que se incluyen, las muestras clínicas que se colectan y las herramientas empleadas para identificar la infección por HVs en algunas patologías.

En la tabla IV.9 se muestra la relación entre la detección del ADN de cada HVs linfotropo y las patologías identificadas en la actual investigación, tanto en muestras de saliva como en el ganglio linfático. Estos resultados demuestran, por primera vez, que es frecuente detectar el ADN de HVs linfotropos en el ganglio linfático de pacientes VIH cubanos con diferentes enfermedades asociadas al Síndrome Adénico. Inclusive, que estos pacientes excretan estos agentes a través de la saliva durante el período de efervescencia de las manifestaciones clínicas. No obstante, otros autores demostraron que los individuos seropositivos al VIH-1 excretan HVs en la saliva en ausencia de signos clínicos de enfermedad (388). Es más, su reactivación asintomática en la cavidad oral se ha reportado por otros autores (389, 390), aunque recientemente se han involucrado en la génesis de la periodontitis de pacientes VIH positivos (391).

Tabla IV.9. Detección del ADN de HVs linfotropos mediante qRT-PCR en saliva y fragmentos de ganglios linfáticos según diagnósticos histopatológicos de pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico (2009-2010).

Diagnósticos	VEB		HVH-6		HVH-8		CMVh		Coinfección	
	Ganglio	Saliva	Ganglio	Saliva	Ganglio	Saliva	Ganglio	Saliva	Ganglio	Saliva
LNH	14/14	10/14	2/14	2/14	1/14	-	-	5/14	3/14	5/14
LH	7/7	7/7	1/7	1/7	-	1/7	-	2/7	1/7	2/7
LR	14/17	14/16	2/17	1/16	2/17	-	1/17	8/16	3/17	8/16
LG	6/6	5/6	2/6	-	-	-	-	1/6	2/6	1/6
SK	2/3	3/3	1/3	-	2/3	2/3	-	1/3	1/3	2/3
HLTV	2/2	1/2	-	-	1/2	1/2	-	2/2	1/2	2/2
Total	45/49	40/48	8/49	4/48	6/49	4/48	1/49	19/48	11/49	20/48

Abreviaturas: **LNH:** linfoma no Hodgkin; **LH:** linfoma de Hodgkin; **LG:** linfadenitis granulomatosa; **LR:** linfadenitis reactiva; **SK:** Sarcoma de Kaposi; **HLTV:** hipertrofia linfoide y transformación vascular.

Hasta el presente, no se ha publicado ningún estudio de autores cubanos en el que se haya explorado la participación del VEB en procesos linfoproliferativos. No obstante, el ADN de este agente se identificó mediante PCR cualitativo en muestras de tejido embebidos en parafina de pacientes con diagnóstico de LNH y LH como parte de un trabajo de tesis de diploma (392). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que este linfocriptovirus está



involucrado en la génesis de los procesos linfoproliferativos (LNH y LH) de población VIH cubana. Quedaría entonces por identificar los mecanismos de interacción virus-hospedero que favorecen la transformación neoplásica de la célula en el contexto de la infección por el VIH, así como su repercusión en el incremento de la incidencia de los linfomas en este grupo poblacional en Cuba. Aunque se reconoce que la infección por VEB en población VIH es común (393), la frecuencia con que se detecta su genoma en procesos linfoproliferativos varía entre los estudios (394). Aún más, esta diferencia se hace mayor cuando se compara la detección de su genoma en el tejido tumoral de individuos infectados (395) y no infectados con el VIH (396). A pesar de esto, se acepta que los individuos seropositivos al VIH-1 poseen mayor riesgo de desarrollar linfomas de células B con mayor variabilidad de subtipos y peor pronóstico (397). En general, cerca del 50% de los linfomas que aparecen en pacientes con SIDA se asocian con la infección por el VEB, aunque el grado de asociación difiere entre los tipos de linfomas. Sin embargo, se ha descrito que cerca del 90% de los LNH de la variedad IB están asociados con la infección por el VEB (398).

Varios autores también reconocieron la participación del VEB en las LR de adultos infectados por VIH pero mediante IHQ (378, 399), así como en niños no VIH (400). Incluso, se ha descrito la reactivación policlonal de la infección por VEB asociada con trastornos linfoproliferativos de evolución benigna en población VIH (401) en los que las herramientas del diagnóstico virológico evitaron la prescripción de tratamientos con citostáticos. Con ello se resalta la importancia del diagnóstico microbiológico en el seguimiento del paciente con Síndrome Adénico, con el que se reduciría el margen de error del método clínico.

La identificación del ADN del VEB en pacientes con LG no se reporta con frecuencia. Sin embargo, existen evidencias sobre la posible interacción entre este agente y las micobacterias (402). Así se ha detectado el genoma del VEB y CMVh en el tejido granulomatoso de lesiones periapicales en molares de humanos (403). Tonoyama y colaboradores sugirieron que este HVs es capaz de reactivarse en la LG por el efecto detonador de la respuesta inflamatoria local en su replicación lítica (404). De cualquier forma, los resultados del presente estudio sugieren que las interacciones entre los micrororganismos oportunistas son complejas y añaden evidencias sobre la posible cooperación entre ellos. Estas interacciones se deberán evaluar en el futuro.

En relación con los resultados obtenidos en las muestras de saliva de los pacientes estudiados se podría comentar que otros autores identificaron la excreción intermitente del VEB en la saliva de forma intermitente, en ausencia incluso de enfermedad. Ello favoreció su aislamiento a partir de este fluido, señalándose que la fuente de infección del epitelio de la cavidad oral son los linfocitos latentemente infectados. Estos, al circular cerca de una superficie epitelial inician un ciclo de



replicación lítica durante el que se fusionan con las células epiteliales de la mucosa oral y terminan transfiriéndole los viriones infecciosos. Así se inicia un foco de replicación epitelial del VEB con el que completa su ciclo de vida y se propaga a un hospedero susceptible (92).

Otros autores detectaron una frecuencia similar de excreción del VEB en la saliva de individuos seropositivos al VIH-1 pero en ausencia de enfermedad (3, 93). Aunque se reconoce que este evento es más común que en individuos no infectados con el VIH (405) y que el uso prolongado de TARVAE favorece la reducción de su CV en este fluido (406). También se ha encontrado en la saliva en receptores de trasplante renal por lo que se recomienda como la muestra idónea para el seguimiento de su infección en la etapa postrasplante (407). Sin embargo, hasta ahora no se había determinado la frecuencia de excreción del VEB en la saliva de pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico (Tabla IV.9).

En cuanto a la detección del ADN del HVH-6 en individuos con Síndrome Adénico, se plantea que este patógeno está involucrado en la progresión a SIDA en pacientes seropositivos al VIH-1, tanto por los resultados obtenidos en estudios *in vitro* (408) como los realizados en animales de experimentación (409, 410). Este agente también se excreta en la saliva de pacientes infectados por el VIH, aunque su frecuencia parece ser inferior si se compara con otros HVs (411, 412). Su genoma se ha detectado en niños con trastornos linfoproliferativos asociados a trasplante (PTLD: siglas del inglés *Posttransplant lymphoproliferative disorder*) y su reactivación se ha constatado en pacientes seronegativos al VIH con diagnóstico de LH y LNH (413). No obstante, se acepta que no participa en la transformación neoplásica celular y su detección en estos pacientes sería el reflejo del daño en la inmunovigilancia del hospedero (414).

Aunque con menor frecuencia, otro de los HVs linfotropos que se detectó en el ganglio linfático de los individuos incluidos en el presente estudio fue el HVH-8 (Tabla IV.9). De esta forma se amplía el espectro de enfermedades con las que puede asociarse su infección en población VIH cubana. Inclusive, los resultados obtenidos confirman hallazgos previos acerca de su excreción en la saliva de individuos seropositivos al VIH (389, 415). Hasta el momento, sólo se había involucrado en la génesis del SK epidémico y clásico, incluso se reconoció su infección asintomática en contactos de pacientes cubanos con SK-SIDA. Así se demuestra que, en Cuba, el HVH-8 puede ser la causa del Síndrome Adénico que aparece en población VIH, incluso involucrarse en procesos linfoproliferativos (LNH y LH). En futuras investigaciones habría que determinar la repercusión de marcadores virales y/o del hospedero que favorecen la linfoproliferación en el individuo infectado con el VIH. En concordancia, existen reportes de casos en los que se demostró la presencia del HVH-8 en ganglios linfáticos de pacientes con: LNH (416), Linfoma de Burkitt y EMC (417).



Asimismo, Engels y colaboradores detectaron mediante IHQ algunas proteínas del HVH-8 en células del ganglio linfático de dos pacientes con LR (418).

La infección primaria por el HVH-8 continúa siendo un aspecto enigmático. Sus características clínicas no se han identificado. Esto quizás se deba a que la seroconversión al HVH-8 se demuestra de forma retrospectiva en adultos inmunocomprometidos (419, 420). Algunos autores describieron los hallazgos clínicos detectados en individuos receptores de trasplante (421) y en niños no VIH de zonas endémicas (422, 423) en los que se piensa ocurrió la primoinfección. Sin embargo, el primer y único reporte en el que se comprobó y describió que el Síndrome Adénico fue la expresión clínica de la infección primaria del HVH-8, se hizo en un individuo seropositivo al VIH. Esto fue posible gracias a la conservación de una muestra de suero que se colectó con otros fines antes del inicio de las manifestaciones clínicas. Así se identificó la seroconversión al HVH-8 y su ADN se amplificó en la adenopatía analizada (11). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se podría considerar que el Síndrome Adénico de los individuos cubanos seropositivos al VIH en los que se detectó el ADN del HVH-8 en el ganglio linfático fue la expresión de la infección primaria por este HVs. Pero lamentablemente, no se pudo llegar a este diagnóstico al no evaluarse la posible seroconversión a este agente. No obstante, sí se demostró que no hubo evidencias clínicas, imagenológicas ni endoscópicas de enfermedad asociada al HVH-8 en ningún otro sistema de órganos.

El ADN del CMVh sólo se detectó en el ganglio linfático de un paciente con LR a pesar que el 39.6% los individuos incluidos en la presente investigación excretaron CMVh en la saliva (Figura IV.12). En concordancia con estos resultados, varios autores aseveran que no es frecuente detectar el genoma del CMVh en el ganglio linfático (424, 425). A nivel internacional se reconoce que la incidencia de las patologías asociadas con este agente ha disminuido después de la introducción de la TARVAE en el control de la infección por el VIH; quizás por el incremento de los niveles de células anti-CMV específicas (426, 427). Contradictoriamente, Huang y colaboradores llegaron a plantear que la infección por CMV juega un importante papel en la transformación celular y la patogenia del LH en aquellos pacientes en los que no se comprueba la infección por VEB (428). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio y la ausencia de otros reportes obligan a cuestionar su participación en procesos linfoproliferativos de población VIH.

En la tabla IV.10 se muestran las coinfecciones que se identificaron en las muestras de saliva y ganglios linfáticos de los individuos estudiados. De esta forma se encontró que las coinfecciones fueron dos veces más frecuentes en la cavidad oral (OR 2.46; IC: 1.02- 5.96; $p = 0.0424$). El 41.7% de estos individuos seropositivos al VIH-1 excretó de forma simultánea varios HVs a través



de la saliva mientras que en el ganglio linfático se encontró en el 22.4% de los pacientes. Entre las coinfecciones en la cavidad oral se comprobó que el 84.2% de los pacientes incluidos excretó dos HVs simultáneamente, mientras que el 15.8% excretó más de dos HVs. De no haberse explorado la presencia de varios HVs linfotropos en ambas muestras clínicas de forma simultánea, no se hubieran identificado estas coinfecciones. Entonces se habría llegado a conclusiones erróneas sobre la participación de dichos agentes en la patogenia del Síndrome Adénico. Con esto se demuestra lo complejo que resultan los procesos infecciosos en individuos con deterioro del sistema inmune. En ellos, se pueden establecer interacciones entre los microorganismos que le permiten reactivarse y colonizar a otros hospederos susceptibles. Por tanto, se refuerza la importancia de incluir el diagnóstico molecular de los HVs linfotropos en el estudio de los pacientes con Síndrome Adénico.

Tabla IV.10. Detección de HVs linfotropos mediante qRT-PCR en muestras de saliva y ganglio linfático de individuos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico (2009-2010).

Coinfección	Ganglio linfático		Saliva	
	No.	%	No.	%
HVH-6 + VEB	6	12.2	-	-
CMVh + VEB			14	29.2
HVH-8 + VEB	4	8.2	1	2.1
CMVh + HVH-8	-	-	1	2.1
HVH-6 + HVH-8 + VEB	1	2	-	-
CMVh + HVH-6 + VEB	-	-	2	4.2
CMVh + HVH-8 + VEB	-	-	1	2.1
CMVh + HVH-6 + HVH-8 + VEB	-	-	1	2.1
No coinfección	38	77.6	28	58.3
Total	49	100	48*	100

*Muestra de saliva no disponible en un paciente

La coinfección entre el VEB y el HVH-8 constituye un ejemplo de la existencia de mecanismos cooperadores entre los HVs que favorecen el desarrollo de algunas patologías en humanos. Así se describió su participación induciendo enfermedad en algunos casos aislados (429, 430), incluso se ha llegado a plantear que en el LEP, la detección de ambos agentes constituye una regla (431) más que una excepción (432, 433). Recientemente, se describió una enfermedad linfoproliferativa germinotrópica asociada con la infección por ambos gammaherpesvirus (GLD siglas del inglés *Germinotropic Lymphoproliferative Disorder*) que se caracteriza por un Síndrome Adénico localizado (434, 435). Inclusive, recientemente se postuló el efecto que puede tener en la transformación celular la síntesis del MicroRNA miR-155 por parte de ambos HVs (436).

Por otra parte, otros autores han encontrado excreción simultánea del VEB y CMV en saliva de pacientes seropositivos al VIH (391), así como la coinfección del VEB y HVH-6 en pacientes con LH (437). En acápite previos (IV.1.1), al evaluar la frecuencia de participación de los HVs en el



SNI, se encontró el ADN de varios HVs en el LCR de pacientes infectados por el VIH, incluso infectando el SNC en unión al *Criptococo neoformans*. Otros autores han reportado su asociación con otros microorganismos a nivel del SNC (216). Recientemente, se ha asociado la detección del VEB y del CMV en el LCR de pacientes seropositivos al VIH con incremento en la mortalidad de pacientes con meningoencefalitis bacterianas (438). Asimismo, Berger y colaboradores encontraron a más de un HVs linfotropo en el anillo de Waldeyer de niños asintomáticos (439), mientras que Qin y colaboradores recientemente identificaron interacciones a nivel molecular entre el HSV-1 y el HVH-8 en las que el primero induce la replicación lítica del último (440).

Hasta el momento, no se conocen los mecanismos moleculares que *in vivo* gobiernan las interacciones entre los diferentes HVs y la de éstos con otros microorganismos. Sin embargo, existen evidencias de su participación en diferentes patologías en humanos (441, 442). A medida que se desarrollan herramientas diagnósticas sensibles se descubre un mundo complejo de interacciones entre agentes biológicos que repercuten en la salud del hospedero. Entonces, habría que reconsiderar el impacto de las infecciones polimicrobianas en las enfermedades infecciosas en diferentes sistemas de órganos, así como el uso del diagnóstico microbiológico en la práctica clínica. Sólo con el desarrollo futuro de investigaciones integradoras se podrá actualizar el espectro de patógenos asociados a determinados procesos infecciosos, con lo que se favorecerá el seguimiento de los individuos afectados.

IV.3.3. Relación entre la CV de los HVs linfotropos con el comportamiento clínico, epidemiológico e histopatológico del Síndrome Adénico de individuos seropositivos al VIH-1.

Una vez caracterizados todos los pacientes seropositivos al VIH con Síndrome Adénico que se diagnosticaron durante el período 2009-2010 en el IPK, se procedió entonces a investigar si la carga viral de HVs linfotropos en el ganglio linfático y saliva constituía un marcador de infección activa en individuos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico. Para ello se comparó entre sí la CV de los HVs linfotropos, encontrándose diferencias significativas ($p = 0.000$) (Figura IV.13). A través de la comparación múltiple que se realizó después, se conoció que la CV del VEB en saliva fue significativamente superior a la CV de este mismo agente en ganglio linfático, incluso mayor que la CV del CMVh en saliva y del HVH-6 en tejido y saliva. Asimismo, se encontró que la CV del HVH-8 en tejido y saliva fue significativamente superior a la CV del CMV en saliva y a la del HVH-6 en saliva y tejido. No existieron diferencias significativas entre la CV del VEB y el HVH-8 en los dos sitios anatómicos estudiados. Es válido aclarar que como el CMVh sólo se detectó en el ganglio linfático de un paciente no se incluyó en este análisis.

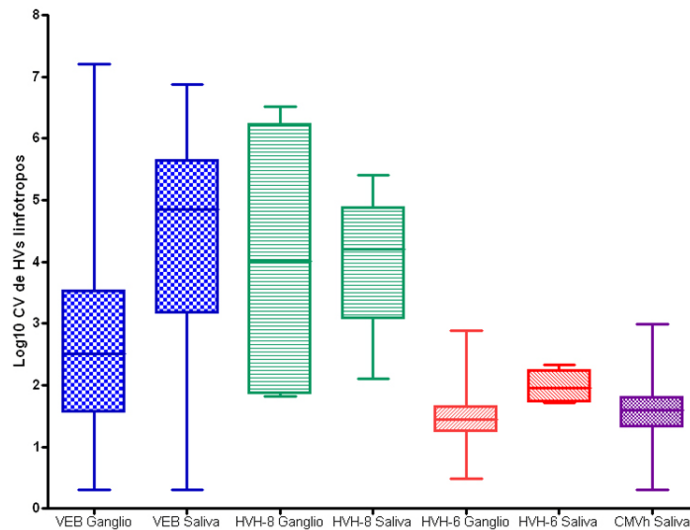


Figura IV.13. Comparación del logaritmo de la CV de HVs linfotropos que se detectó mediante qRT-PCR en muestras de saliva y ganglios linfáticos de pacientes seropositivos al VIH con Síndrome Adénico (2009-2010).

Las diferencias que se encontraron entre los valores de CV de los HVs linfotropos permiten diferenciar el grado de replicación de estos agentes en los compartimentos estudiados. En este sentido, en la cavidad oral de los pacientes VIH positivos con Síndrome Adénico tiene lugar una replicación activa del VEB que le permite excretarse con alta CV en la saliva de estos individuos, a diferencia del grado de replicación del HVH-6 y el CMVh. La menor frecuencia de detección de estos últimos, con valores de CV significativamente inferiores sugieren que ellos no tienen una participación importante en este síndrome. No obstante, su identificación señala la posible existencia de mecanismos cooperadores entre estos agentes en los que la replicación de unos pudiera favorecer la de otros. Aunque su significación clínica permanece en la incógnita.

Lo mismo sucede con el HVH-8, el que logra establecer una replicación lítica que favorece tanto la progresión de la infección en el tejido linfoide como la transmisión mediante la saliva de individuos infectados. Lo cierto es que la introducción de herramientas sensibles en el estudio de la infección viral en determinadas patologías, permite descubrir la complejidad de los mecanismos involucrados en la replicación de estos agentes. Recientemente se involucró la participación de varios virus oncogénicos en una neoplasia escamosa de las superficies oculares que incrementa su incidencia en África (443). Igualmente, aunque en un escenario diferente, Jacobson y colaboradores encontraron que la CV del VEB era mayor que la del CMVh y la de éste a su vez mayor que la del HVH-8 en la saliva de individuos seropositivos al VIH-1 con evidencias clínicas de restauración inmune por tratamiento sostenido con TARVAE (388). También se reconoció mediante ensayos de qRT-PCR que el VEB es capaz de mantener una replicación activa en la



cavidad oral de pacientes con mononucleosis infecciosa, incluso con altos valores de CV durante meses, asumiéndose que desaparece tardíamente (444, 445).

Otros autores comprobaron que los valores de CV del VEB en pacientes seropositivos al VIH-1 pueden alterar la competencia de la respuesta inmune de células T. Es por ello que después de la infección primaria por el VIH-1 en un portador del VEB se produce un incremento temprano de la CV del VEB en sangre, que puede mantenerse elevada durante el primer año tras la infección por ese retrovirus. Durante esta etapa no se deteriora la respuesta inmune, por el contrario, incrementa la respuesta de linfocitos T CD8+ debido a la intensificación del reto antigénico (388). En algunos pacientes la CV del VEB comienza a incrementarse en etapas posteriores cuando progresan al SIDA. En ese momento, sólo aquellos que posean células T CD4+ residuales competentes que de forma compensatoria induzcan un incremento de las células anti-VEB T CD8+ controlarán la replicación de este HVs. De lo contrario, el fallo de la respuesta inmune hace que el paciente esté en riesgo de desarrollar una enfermedad linfoproliferativa asociada con el VEB (446, 447). Un hallazgo más preocupante aún es que la mejoría del estatus inmunológico que se logra después del uso prolongado con TARVAE en pacientes VIH no tiene ningún efecto en la CV del VEB, a pesar de restaurarse la respuesta específica anti EBNA-1 (448).

Una vez que se conoció el valor de la CV de HVs linfotropos en la diferenciación del grado de replicación de estos agentes en pacientes con Síndrome Adénico, se decidió entonces evaluar su utilidad en el diagnóstico etiológico. En un intento por caracterizar, por primera vez, el Síndrome Adénico en este grupo poblacional también se exploró la existencia de relación entre la CV de estos agentes y los resultados de ensayos serológicos, los hallazgos histopatológicos y clínico-epidemiológicos. De esta forma se encontró que no existe relación entre la CV de los HVs linfotropos y: los hallazgos clínicos (síntomas y signos), la CV del VIH-1 en plasma, la edad, el sexo, el color de piel de los pacientes.

Se comprobó que la presencia de Acs en el suero contra diferentes Acs del VEB no se relaciona con el diagnóstico histopatológico ($p > 0.05$) (Figura IV.14). Tampoco se encontró asociación entre los resultados de la serología del VEB y la CV de este agente en ganglio linfático y saliva ($p > 0.05$). La IgM anti-VCA como marcador de infección primaria del VEB sólo se detectó en dos pacientes: uno con LG y otro con LH. Esta última asociación incluso no guarda relación lógica con los conocimientos acumulados hasta el momento pues no se ha descrito que el LH pueda aparecer durante la infección primaria por el VEB. Por otra parte, la IgM anti-VCA como indicador de la reactivación del VEB se detectó en cuatro pacientes con linfomas, en dos pacientes con LR y uno con HLTV.

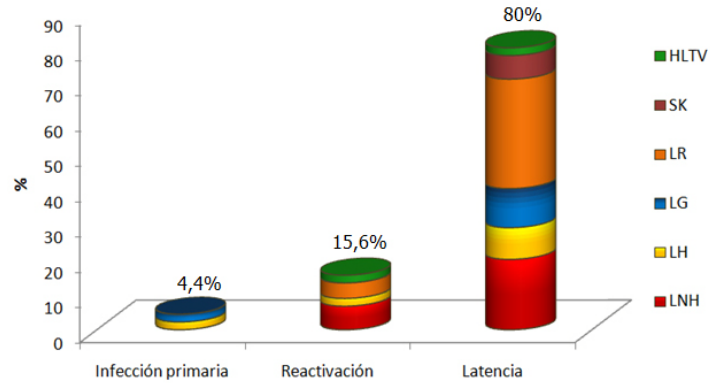


Figura IV.14. Clasificación de la infección por el VEB según los marcadores serológicos detectados en pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico teniendo en cuenta los diagnósticos histopatológicos (2009-2010).

La IgM anti-CMVh no se detectó en ningún paciente incluido en la presente investigación a pesar que el ADN de este HVs se amplificó en el ganglio linfático de un paciente con LR y el 39.6% lo excretaba en la saliva al momento de la biopsia. Por otra parte, la serología del HVH-6 demostró que 48/49 pacientes estaban infectados por este agente, pero como sólo se pesquisaron Acs IgG anti-HVH-6 no se puede llegar a conclusiones sobre su utilidad en el diagnóstico diferencial del Síndrome Adénico. En congruencia, se reconoce la limitación de los ensayos serológicos en el diagnóstico de la infección por patógenos latentes. No solo por la elevada seroprevalencia referida en acápites previos, sino por limitaciones inherentes a los ensayos inmunoenzimáticos y su poca utilidad en individuos con sistema inmune deteriorado. Estos individuos no logran establecer una respuesta adecuada de Acs (85, 163). Por tanto, se recomienda la detección del virus o de sus componentes como indicador de infección activa, en contraste con el escaso significado clínico que tiene determinar el título de Acs (33, 449). No obstante, se han descrito ciertos patrones serológicos del VEB que pueden considerarse de riesgo para el desarrollo de la leucemia linfocítica crónica (450); inclusive, otros consideran que en la pesquisa del carcinoma nasofaríngeo en poblaciones de alto riesgo se puede utilizar el título de Acs IgA anti-VEB (451, 452) mientras que algunos no concuerdan (152).

Aunque se acepta que el genoma del VEB se mantiene en estado latente en la mayoría de las células tumorales, en estudios previos se reconoció mediante hibridación *in situ* que este agente expresa algunos genes líticos en las células linfoides infiltrativas del carcinoma nasofaríngeo (453, 454). En consecuencia, se sugiere que la expresión de sus Acs líticos en el estroma del tumor induce una respuesta de Acs específicos. Su reconocimiento contribuiría a la caracterización serológica de la infección por VEB en estos pacientes (455-457), pero lamentablemente no se han identificado aún. Independientemente, se reconoce que la interpretación de los resultados de



la serología de VEB puede ser compleja, llegando a describir varios patrones serológicos según el número de marcadores que se evalúan y en las patologías que se emplea (164).

Por todo lo que se ha comentado con anterioridad y teniendo en cuenta los resultados del presente estudio se debe evitar el uso de la serología de HVs linfotropos como única herramienta a utilizar en el diagnóstico diferencial del Síndrome Adénico en individuos seropositivos al VIH. Aún más, su uso en el manejo de pacientes no infectados con el VIH habría que evaluarlo en el futuro. Más aún cuando otros autores recomiendan actualmente que el monitoreo de la infección por el VEB en receptores de trasplante y en pacientes con procesos linfoproliferativos se debe realizar con protocolos cuantitativos de PCR (458).

Se decidió entonces, comparar los resultados cualitativos del qRT-PCR del VEB en el ganglio linfático y saliva con los diagnósticos histopatológicos identificados en los pacientes estudiados. Así se conoció que no existe asociación entre la detección del ADN del VEB en saliva y tejido linfoide, con un diagnóstico histopatológico específico ($p=0.112$). Con ello se resalta que la simple detección del genoma de este HVs mediante PCR a punto final no sería útil en el diagnóstico nosológico del Síndrome Adénico. Por el contrario, sí se encontró asociación significativa entre la CV del VEB por encima de las 1000 copias con el diagnóstico de linfoma ($p=0.0243$); fue cuatro veces más frecuente su diagnóstico en pacientes en los que se detectó más de 1000 copias del ADN del VEB en el ganglio linfático (OR 4; IC: 1.16 - 13.99). Incluso, cuando se comparó la CV de este HVs entre las patologías identificadas en la presente cohorte se pudo reconocer que fue significativamente mayor en los pacientes con diagnóstico de LH ($p=0.0295$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de la CV del VEB entre los diferentes subtipos de LNH y de LH ($p>0.05$).

Hasta el momento, no se había definido el valor de la CV del VEB en el tejido linfoide de pacientes con Síndrome Adénico. A partir de los resultados del presente estudio se sugiere que en individuos seropositivos al VIH-1 la CV del VEB además de ser un indicador de su infección, podría utilizarse como marcador de proceso linfoproliferativo, específicamente de LH. Otros autores reconocen su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con trastornos linfoproliferativos post-trasplante (459, 460). Recientemente, se ha llegado a proponer la detección del ADN del VEB en plasma como marcador de LH de la infancia (461); inclusive su CV se considera un indicador útil para el monitoreo de la respuesta a la terapia en pacientes con LNH de estirpe B (462).

Actualmente, se plantea que la detección del genoma del VEB no es suficiente para reconocer su participación en determinadas patologías. Este HVs es un patógeno ubicuo que establece



latencia en los linfocitos B tras la infección primaria, se estima que los individuos con infección asintomática poseen de 1 a 50 células infectadas por cada 5 000 000 de leucocitos (463). De ahí se infiere que el valor promedio de su CV en sangre total es de aproximadamente 7 copias por millón leucocitos (rango 1-30 copias) (464). Esto traduce la limitación que enfrenta la interpretación clínica del hallazgo del ADN del VEB en cualquier tejido que pueda tener linfocitos B, mientras que refuerza la importancia de determinar su CV. Aún más, su empleo combinado con el diagnóstico histopatológico garantizará mayor precisión diagnóstica, reducirá el margen de error y garantizará mejor seguimiento de las patologías asociadas con su infección (465).

Por otra parte, se compararon los resultados del qRT-PCR del VEB con los de la IHQ pues la mayoría de los estudios utilizan este último proceder como único método para identificar y clasificar la infección por VEB en los procesos linfoproliferativos. De esta forma no se encontró relación entre la inmunolocalización de la LMP1 en el ganglio linfático de los LNH con la detección del ADN del VEB mediante qRT-PCR ni en el tejido linfoide ni en saliva. Esta proteína se identificó en tres fragmentos de ganglios linfáticos de pacientes con LNH, mientras que su genoma se encontró en los 14 pacientes con diagnóstico de LNH. Tampoco hubo asociación entre la CV del VEB en ganglio con la detección de la LMP1 en el tejido linfoide ($p=0.778$). Por tanto, la IHQ no permitió identificar la participación del VEB en la oncogénesis de estos pacientes, a pesar de los valores de CV y las evidencias serológicas de su infección latente en el 100% de los individuos en los que se diagnosticó un LNH. No obstante, otros autores recomiendan emplear Acs monoclonales contra varias proteínas del VEB y así garantizar una mejor caracterización de los linfomas por IHQ (379).

A pesar de que la IHQ permite clasificar los linfomas, se reconoce que con ella se describen muchas "zonas grises" con solapamiento de características morfológicas e inmunofenotípicas de las células transformadas. Esto hace que en ocasiones se complique la interpretación de los resultados (466). Inclusive, otros autores han descrito problemas técnicos debido a la identificación de falsos positivos por reactividad cruzada de algunos Acs monoclonales con proteínas del hospedero (467). Ante estas evidencias y debido a la falta de correlación entre los resultados de la IHQ con el qRT-PCR del VEB se refuerza el uso de este último en la caracterización de su infección en los LNH. Más aún si otros autores encontraron concordancia entre la CV del ADN del VEB y la expresión de los EBERs entre pacientes con LH y LNH (468). Esta última herramienta actualmente se considera una técnica sensible para identificar la infección por VEB en las células tumorales (380). Con ello se demuestra la utilidad de ambos métodos para reconocer su participación en la transformación celular de dichos procesos malignos (468).



En el presente acápite también se encontró asociación significativa entre la detección del ADN del HVH-8 en el ganglio linfático con el diagnóstico histopatológico de SK (OR 21; IC: 1.54-285.7; $p=0.0030$). Una vez más se demuestra su participación en este tipo de neoplasia, sólo que esta vez a nivel del ganglio linfático de pacientes en los que su forma de presentación fue un Síndrome Adénico. Entonces la detección del genoma de este HVs linfotropo en el tejido tumoral puede considerarse también un marcador útil en el diagnóstico diferencial de este Síndrome. Aún más, alertaría al médico de asistencia en el seguimiento periódico del paciente con infección por este agente. Principalmente, en los que se identificaron la LR y la HLTV, pues éstas pudieran representar estadios iniciales de una neoplasia. Sobre todo, si se ha descrito previamente que los individuos infectados por el HVH-8 y el VIH tienen un incremento del 60% en la probabilidad de desarrollar un SK por año tras la infección por el VIH (369).

Según los resultados obtenidos, se evaluó si el qRT-PCR de HVs linfotropos en la saliva de pacientes con Síndrome Adénico orientaría su diagnóstico diferencial antes de indicar la biopsia del ganglio linfático. En este sentido, no se encontró asociación entre la CV del VEB, HVH-6 ni CMVh en saliva y su detección en el ganglio linfático, como tampoco se reconoció asociación significativa con una enfermedad específica ($p> 0.05$). Sin embargo, fue diez veces más frecuente que los pacientes con Síndrome Adénico en los que se detectó el ADN del HVH-8 en la saliva tuvieran una infección activa de este HVs en el ganglio linfático (OR 10; IC 1.09-91.44; $p=0.0179$). Por tanto, se podría indicar el qRT-PCR del HVH-8 en la saliva para el estudio del Síndrome Adénico de los individuos seropositivos al VIH, antes de la biopsia del ganglio linfático. En este caso, debido a la baja frecuencia de detección de este agente en el ganglio linfático y en saliva, su indicación no reemplazaría la biopsia del ganglio.

En el presente estudio fue más frecuente detectar el genoma del CMVh en la saliva de pacientes seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico que en el ganglio linfático (OR 30.8; IC: 3.91 - 242.43; $p= 0.0000$). En concordancia con otros autores (93), se encontró que la detección del ADN de CMVh en la saliva fue seis veces más frecuente en individuos con conteo de linfocitos TCD4+ menor de 200 céls/mm³ (OR 6.0; IC: 1.57- 22.88; $p=0.0062$). Como el ADN de CMVh se detectó solo en el ganglio linfático de un paciente, no se pudo establecer comparaciones con el resto de las variables. Sin embargo, se reconoce que este agente no es una causa frecuente de Síndrome Adénico entre individuos cubanos seropositivos al VIH-1, su detección en saliva traduce el estado de inmunodepresión que padecen estos pacientes.



Finalmente, debido a la identificación de las coinfecciones por varios HVs linfotropos tanto en saliva como en ganglio linfático, se decidió analizar su comportamiento. De esta forma se conoció que tanto la detección del HVH-6 (OR 64; IC: 6.3-669.1; $p=0.0000$) como la del HVH-8 (OR 30; IC: 3.0-311.8; $p=0.0001$) en el ganglio linfático se asoció con la coinfección por el VEB. Inclusive, la detección del ADN de CMVh ($p < 0.01$) y del HVH-8 ($p = 0.0134$) se asoció de forma significativa con la presencia de otro HVs en la saliva. Las coinfecciones en ambas muestras no se asociaron con ningún diagnóstico histopatológico, inclusive no existió relación entre las coinfecciones en la cavidad oral con las que se identificaron en el ganglio linfático ($p > 0.05$). Sin embargo, se conoció que fue nueve veces más frecuente que los pacientes con marcada inmunodrepsión (linfocitos TCD4+ < 200 células/mm³) excretaran varios HVs en saliva (OR 9.33; IC: 1.80-48.37; $p = 0.0048$). Aún más, se encontró que la CV del VEB por encima de 1000 copias en ganglio linfático (OR 4.48; IC: 1.26-15.81; $p=0.0165$) y en saliva (OR 6.56; IC: 1.09-39.32; $p = 0.0284$) se asoció con las coinfecciones en la saliva. Sin embargo, no se encontró asociación entre la CV del VEB en el ganglio linfático y las coinfecciones en este órgano linfoide ($p=0.8949$).

Desde los inicios de la epidemia del VIH se reconoce la importancia del tejido linfoide en las manifestaciones clínicas y la patogenia de la infección por este agente. De igual forma se ha comprobado que varios microorganismos pueden producir un aumento de volumen de los ganglios linfáticos en dichos individuos; en los que existe un daño de la función de este órgano del sistema linfoide (15). Si a esto se agrega la incapacidad que tienen de expandir células T vírgenes o células T de memoria con el subsecuente deterioro de la respuesta inmune de células B y T contra Ags nuevos o conocidos (469, 470); entonces se comprendería el porqué de la susceptibilidad a la infección por diferentes agentes.

Lacroix y colaboradores detectaron el ADN del VEB y HVH-6 en el ganglio linfático de pacientes seronegativos al VIH con diagnóstico de LH, incluso reportaron que la CV de ambos HVs fue mayor en aquellos pacientes que estaban coinfectados (437). Posteriormente, ese mismo colectivo lo involucró en la génesis de la variante esclerosis nodular del LH (471). Sin embargo, teniendo en cuenta los hallazgos del presente estudio se cuestiona el papel de dicha coinfección en el LH. Esta combinación sólo se identificó en un paciente con LH y en dos de los pacientes con LNH. Es más, el ADN de estos HVs se detectó en el tejido linfoide de individuos con otras patologías no exploradas por ese colectivo (Tabla IV.9). Si a esto se añade que: 1) la CV del HVH-6 fue significativamente inferior a la del VEB en saliva y HVH8 en tejido, 2) no existió relación directa entre la amplificación de su ADN con una patología específica. Entonces se puede afirmar



que la detección del HVH-6 en el tejido de los pacientes incluidos en la presente investigación corresponde con la amplificación a partir de células latentemente infectadas.

Griffin y colaboradores notificaron que era frecuente la reactivación simultánea en la cavidad oral del VEB y CMVh en individuos seropositivos al VIH, en ausencia de signos clínicos. Señalaron incluso que existen algunos factores específicos para cada HVs que posiblemente repercuten en su excreción (3). Aunque en otro sitio mucoso, la reactivación simultánea de estos dos HVs también se demostró en las vesículas seminales de individuos seropositivos al VIH-1, posiblemente a consecuencia del incremento en la presencia de citoquinas en el semen de estos pacientes (75). No obstante, se desconoce si la reactivación de estos agentes se relaciona con déficits generales de la respuesta inmune del hospedero que son comunes a todos los patógenos o si se relacionan con inmunodeficiencias patógeno específicas.

Lo cierto es que, hasta el momento, se desconoce el papel de la respuesta inmune del hospedero inmunocompetente en el control de la infección por HVs. Por tanto, la identificación de los mediadores de la respuesta inmune en los individuos seropositivos al VIH resulta más complicada aún. En algunos estudios se ha llegado a reconocer que no existen diferencias en la excreción de varios HVs en la saliva entre individuos infectados y no infectados por el VIH, ni asociación entre la prevalencia de los HVs en la saliva de pacientes seropositivos al VIH-1 con el conteo de linfocitos TCD4+ (145). Aunque, otros han demostrado que existe una pérdida significativa del linfocitos TCD4+ y de células con actividad citotóxica (GranzimaB positivas) en el interior del tejido tumoral de pacientes VIH positivos con diagnóstico de LH (472). También se ha involucrado el posible efecto del estrés psicosocial y de las condiciones desfavorables de vida en la reactivación del VEB y del VHS-2 (80).

IV.4. Caracterización molecular del HVH-8 en pacientes con algunas enfermedades asociadas con este agente

IV.4.1. CV y los subtipos del HVH-8 en diferentes muestras clínicas de pacientes seropositivos al VIH-1 con enfermedades asociadas con este agente

El análisis filogenético de las secuencias del HVH-8 que se identificaron en las muestras de pacientes incluidos en el presente estudio confirmó el reporte previo sobre la circulación de diferentes subtipos de este HVs en población VIH cubana (37, 38). Durante el período 2005-2011 se identificó la infección por los subtipos B, A, C, A5 y E del HVH-8 en el 31.9%, 23.4%, 19.1%, 17% y 8.5%; respectivamente, de pacientes con enfermedades asociadas con su infección (Figura IV.15).

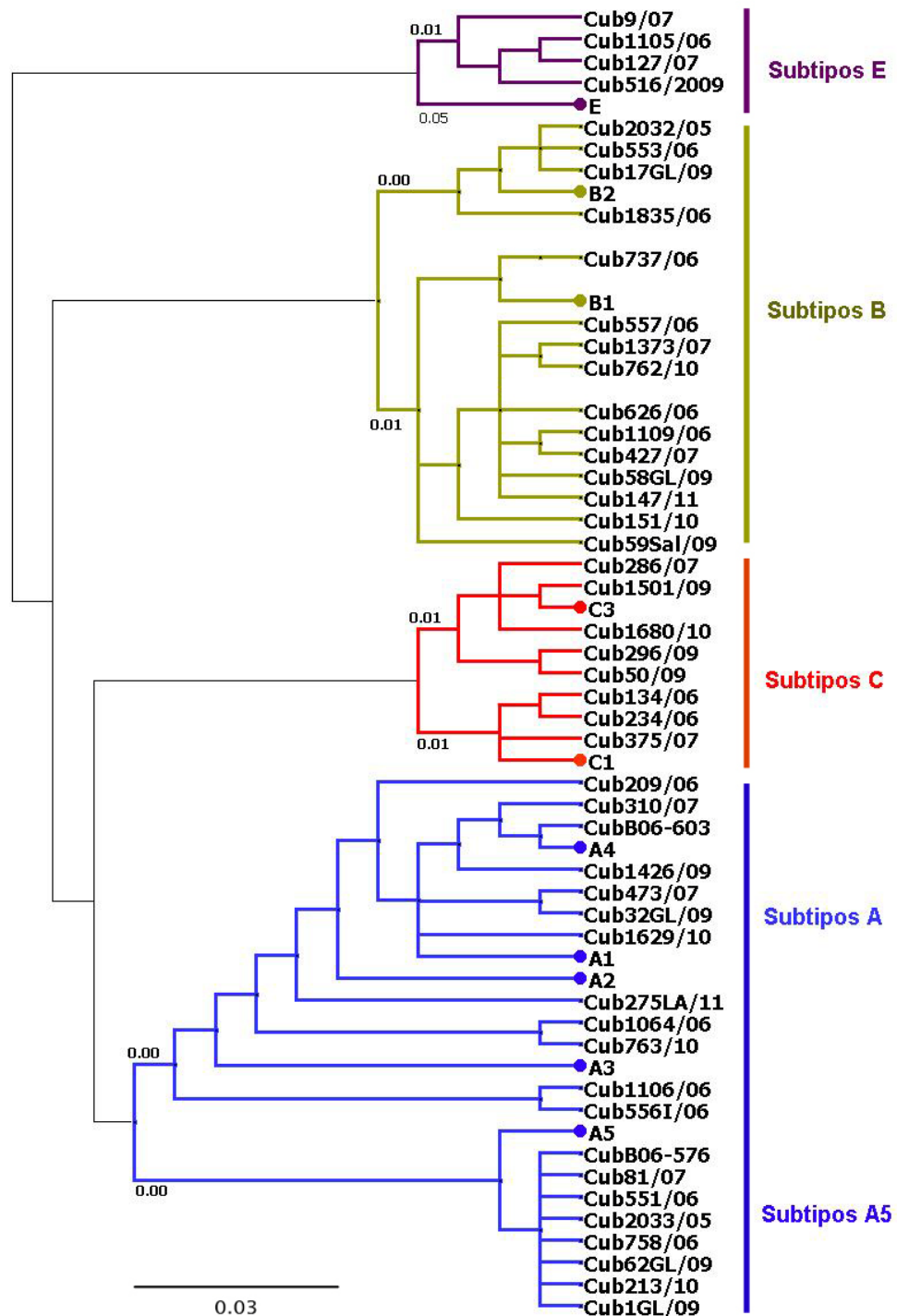


Figura IV.15. Árbol filogenético no rotado que se generó por el método de máxima verosimilitud (ML) a partir de las secuencias del fragmento del gen ORF-K1 del HVH-8 que se identificó en muestras de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 con enfermedades asociadas a su infección. El análisis filogenético derivó del método de máxima verosimilitud en el que se empleó el criterio informativo Akaike en el programa PAUP4.0b (Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA). La confiabilidad del árbol se evaluó mediante el análisis de 1000 réplicas. El número de cada nodo indica la probabilidad (p) con que se apoya la agrupación de las secuencias. Las cepas de referencia de cada uno de los subtipos se marcan con ● del color correspondiente al Subtipo.



En los primeros estudios en que se realizó la caracterización molecular del HVH-8 se describió una restricción geográfica de los subtipos del HVH-8. De esta forma se identificó que los subtipos A y C circulaban en Europa, EUA, Australia y en el Medio Oriente; mientras que en Asia sólo circulaba el subtipo C. Los subtipos B y A5 se reconocieron fundamentalmente en África y el subtipo D en el sudeste Asiático, Australia e islas del Pacífico. Finalmente, el subtipo E se encontró en amerindios de Brasil (473) y Ecuador (474). También se describieron dos subtipos que no se han identificado en otras áreas geográficas, un subtipo Z que se detectó en un niño residente en Zambia (475) y otro subtipo F en nativos de una tribu de Uganda (476).

Se plantea que los subtipos del HVH-8 han co-evolucionado con determinadas poblaciones. En esta hipótesis se propuso que su diseminación en el planeta guarda relación con el origen de las migraciones humanas desde África a partir de tres momentos. La primera de esas migraciones hacia el otro lado de África Subsahariana se piensa que comenzó 100 000 años atrás (Subtipos B). La segunda se dirigió hacia el sur de Asia y posteriormente hasta Australia, Taiwán y las islas del Pacífico entre 60 000 y 70 000 años (Subtipo D). En la tercera de estas migraciones hubo bifurcación en la dirección, una se dirigió hacia Europa y norte de Asia aproximadamente 35 000 años atrás (Subtipos A y C) y la otra se expandió hacia las Américas (Subtipo E) y norte de Europa, aproximadamente 15 000 y 10 000 años atrás; respectivamente (477).

Sin embargo, en estas hipótesis no se contempla el papel que han podido ejercer las recientes migraciones humanas en la introducción del HVH-8 en el continente Americano. Los hallazgos de estudios previos realizados en Cuba denotaron que existe una circulación variable de subtipos del HVH-8 (A-C y E), tanto en población VIH (37, 38), como en población no VIH (326). En concordancia, otros autores encontraron resultados similares en Perú (478), Venezuela (479), Brasil (480) y Guyana Francesa (481). No obstante, a excepción del estudio de Brasil, el número de pacientes que se incluyó en dichos estudios filogenéticos es muy reducido, mayoritariamente en pacientes con SK-SIDA. Todo esto dificulta la identificación de los orígenes de este patógeno en las Américas, pero traducen el marcado mestizaje que existe en la población americana receptora de genes de diversas latitudes.

La frecuencia de identificación de los subtipos del HVH-8 del presente estudio se comparó con la que se reconoció en el período 1991-2004 (Tabla IV.11). De esta forma se encontró que existían diferencias significativas en la identificación de los subtipos entre ambos períodos ($p=0.0132$), por lo que se procedió a identificar cuál de los subtipos era el que definía esta significación. Entonces se descubrió que fue seis veces más frecuente detectar pacientes infectados con subtipos B en el período 2005-2011 que aquellos infectados con subtipo A (OR 6.13; IC 1.88 - 19.93; $p=0.0017$).



Asimismo, se encontró incremento significativo en el diagnóstico de subtipos E en comparación con los subtipos A ($p=0.0243$), aunque esta asociación no constituyó un riesgo (OR 9.81; IC: 0.98-97.99).

Tabla IV.11. Distribución de los subtipos del HVH-8 que se identificaron en Cuba según los períodos de estudio. (2005-2011; 1991-2004).

Subtipos HVH-8	2005-2011	2004-1991	Total
A	11	27	38
B	15	6	21
C	9	9	18
E	4	1	5
A5	8	6	14
Total	47	49	96

Hasta el momento, no se habían reportado cambios en la circulación de los subtipos del HVH-8 en un grupo de individuos de una misma zona geográfica. Los resultados obtenidos en el presente estudio así lo demuestran. No obstante, White y colaboradores sí encontraron mayor diversidad genética y selección positiva del subtipo B, comparado con el subtipo A5 en residentes de Zimbabwe (482). Quizás el subtipo B que circula en Cuba ha logrado evolutivamente mayor patogenicidad con transmisión eficiente entre individuos seropositivos al VIH-1, a pesar del uso de la TARVAE. Esto puede guardar relación con el reporte mantenido de casos de SK-SIDA en ese grupo poblacional. Ahora bien, será necesario identificar los mecanismos que favorecen la transmisión de un subtipo más que del otro, inclusive sobre la capacidad de los mismos para producir enfermedad. Es válido aclarar que las secuencias del HVH-8 del presente acápite se obtuvieron a partir de pacientes con enfermedades asociadas con su infección. Por lo tanto, no se puede descartar el efecto de una mayor virulencia del subtipo B en individuos inmunocomprometidos que conlleven a una sobrestimación de su incidencia. Su impacto tendrá que evaluarse en futuras investigaciones a partir de individuos infectados con el HVH-8 pero sin evidencias clínicas de enfermedad.

IV.4.2. Relación entre la CV y el subtipo del HVH-8 con el comportamiento clínico, epidemiológico e histopatológico

Muy pocos estudios se han realizado con vistas a evaluar el efecto de marcadores del HVH-8 en el desarrollo de las enfermedades que este HVs produce en individuos seropositivos al VIH-1. Tal vez a consecuencia de la distribución geográfica de los subtipos del HVH-8 en determinadas poblaciones, el número reducido de pacientes que se pueden reclutar y además por la incidencia tan baja de las enfermedades que este agente es capaz de producir. Por tanto, el presente estudio reúne condiciones favorables para evaluar el efecto de la CV y el subtipo del HVH-8 en el desarrollo de diferentes patologías, debido a la circulación simultánea de varios subtipos de este



radinovirus en población VIH cubana. No obstante, se reconoce que el número de pacientes con otras enfermedades no SK-SIDA también es limitado.

En el presente estudio se comprobó la capacidad oncogénica de los subtipos del HVH-8 al detectarse en muestras clínicas de pacientes con enfermedades asociadas con su infección (Tabla IV.12). Sin embargo, el subtipo E solo se encontró en pacientes con diagnóstico de SK-SIDA. En el 60% de los pacientes con linfomas de células B (LNH, LH, LEP) se reconoció la infección por el subtipo B. Existió asociación significativa entre la infección por el subtipo A5 con el diagnóstico de linfadenopatía relacionada con el SIDA ($p=0.0259$) (Cub 1GL/09 y Cub 62GL/09), mientras que el resto de las patologías que se diagnosticaron en fragmentos de ganglios linfáticos se reconoció la infección por diferentes subtipos del HVH-8.

Tabla IV.12. Distribución de los subtipos del HVH-8 según el diagnóstico histopatológico que se identificó en pacientes seropositivos al VIH-1(2005-2011).

	Subtipos del HVH-8				
	A	B	C	E	A5
SK-SIDA	9 (81.8%)	11 (73.3%)	7 (77.8%)	4 (100%)	6 (75%)
LEP	1 (9.1%)	1 (6.7%)	1 (11.1%)	-	-
LNH y LH	-	2 (13.3%)	-	-	-
SK en ganglio	-	1 (6.7%)	1 (11.1%)	-	-
Linfadenopatía relacionada con el SIDA	-	-	-	-	2 (25%)
HLTV	1 (9.1%)	-	-	-	-
Total	11 (100%)	15 (100%)	9 (100%)	4 (100%)	8 (100%)

Contrario a los resultados de otros autores (483), la secuenciación del gen ORF-K1 permitió reconocer que la capacidad oncogénica del HVH-8 es un factor independiente del subtipo viral. Otros han involucrado a varios subtipos de este HVs en la génesis de las variantes clínico-epidemiológicas del SK, con una frecuencia variable (477, 484). No obstante, en concordancia con Cassar y colaboradores, se descubrió que el subtipo E del HVH-8 que circula en población VIH cubana es capaz de producir SK (478); a pesar que en amerindios de Brasil este subtipo no se relacionó con el SK (473). Este subtipo entonces podría representar un subtipo autóctono cubano que al parecer incrementa su circulación entre individuos seropositivos al VIH-1, en los que sí es capaz de transformar células endoteliales.

A pesar de la variación en la frecuencia de identificación del subtipo B del HVH-8, no se puede ser categórico en cuanto a su asociación con los linfomas de células B. Sólo se alerta sobre el incremento en el espectro de patologías tumorales que este subtipo es capaz de producir en



individuos seropositivos al VIH-1. No obstante, sería válido resaltar que la participación del HVH-8 entre las variantes de LNH es controversial y motivo de debate actual. Algunos coinciden en que si se detecta su ADN en el ganglio linfático de pacientes VIH positivos con diagnóstico de un proceso linfoproliferativo éste HVs está involucrado en la patogenia de la enfermedad y no se deberá considerar un simple hallazgo de la infección oportunista. Incluso, se ha sugerido que la activación del sistema de señales a partir del receptor de IL-6 podría tener un rol importante en la mayoría de los casos (485). Otros autores describieron casos raros de LNH variedad IB positivos al HVH-8 en tejidos sólidos de pacientes VIH y propusieron que se consideraran LEP extracavitarios. Estos tumores son idénticos al LEP desde el punto de vista morfológico, inmunofenotípico y genético a pesar de discretas diferencias en la expresión de inmunoglobulinas, presentación y curso clínico (486).

Por tanto, a partir de los conocimientos actuales habría que reevaluar la participación de los subtipos del HVH-8 en los LNH que aparecen en población VIH cubana. Se necesita de una caracterización integradora de los linfomas en los que se debe incluir el diagnóstico virológico, pues la participación de los gammaherpesvirus en procesos linfoproliferativos es una realidad. No obstante, se debe resaltar que la CV del HVH-8 (66 copias/100ng ADNg) en el ganglio linfático fue inferior a la CV del VEB (32 440 000 copias/100ng ADNg) en el paciente que se diagnóstico un LNH de células grandes difuso variedad IB. Además, en el paciente con diagnóstico de LH el genoma del HVH-8 se amplificó a partir de la muestra de saliva simultáneamente con otros HVs (CMVh, HVH-6 y VEB) no en el ganglio linfático. Habrá que definir en el futuro próximo la factibilidad de incluir tanto métodos moleculares como inmunohistoquímicos para identificar la presencia del HVH-8 en la caracterización de los linfomas. Herramientas que hasta el momento nuestro país no contaba.

El LEP no es una forma común de evolucionar la infección por el HVH-8 y los reportes en la literatura son escasos. Los primeros casos de LEP se describieron en pacientes SIDA en el año 1989 en los EUA (487). Actualmente se considera una enfermedad poco común que representa entre el 3 y 4% de los LNH asociados a la infección por el VIH (488, 489). De hecho, los pacientes con LEP incluidos en este acápite constituyen los primeros casos que se diagnostican en Cuba desde el inicio de la epidemia del VIH en 1986. El conocimiento de que los tres pacientes estaban infectados con subtipos diferentes del HVH-8 (Tabla IV.12), demuestra que el subtipo infectante no es un marcador que define el desarrollo del LEP. En esta variedad de linfoma, sí se acepta que la infección por el HVH-8 constituye una regla (490), más que una excepción (491).



Además, se debe añadir que en concordancia con otros autores (7, 492) el ADN del VEB se detectó en la efusión de los tres pacientes con LEP, con lo que se reconoce el papel de la coinfección por ambos gammaherpesvirus en su génesis. En la mayoría de los casos de LEP reportados hasta el momento, se ha detectado mediante hibridación *in situ* la presencia de ARNm del VEB en las células tumorales. Es por ello que se ha implicado como un posible cofactor para el desarrollo de la enfermedad, aunque los mecanismos que intervienen no se han dilucidado (493). Según algunos estudios se ha sugerido que existen interacciones a nivel molecular entre el HVH-8, el VEB y el VIH-1 que promueven tanto el establecimiento de la infección latente como la replicación lítica en las células coinfectadas (494, 495).

La mayor parte de las series de casos con diagnóstico de LEP que se han publicado provenientes de América, Italia, España y Francia comparten determinadas características clínicas y epidemiológicas. EL LEP aparece en homosexuales, blancos, entre los 37 y 44 años de edad, las mujeres excepcionalmente resultan afectadas (489, 496-500). Los síntomas traducen el efecto de masa ocasionado por la acumulación del derrame en la cavidad (490). Generalmente son individuos seropositivos al VIH con una disminución del conteo de linfocitos T CD4+ al momento del diagnóstico (279). En un número significativo de estos pacientes se recoge el antecedente de SK o de EMC. En comparación con otros LNH asociados al SIDA, el riesgo de padecer un LEP es mayor en aquellos individuos en los que se ha diagnosticado previamente un SK (501).

También se comparó la secuencia aminoacídica del HVH-8 identificada en pacientes con LEP y la de aquellos infectados por el mismo subtipo pero con otras patologías identificadas en el mismo período. Sólo se encontró un cambio de S por F en la posición 84 del subtipo B del HVH-8 que se detectó en el paciente con efusión pleural (Cub 427/07), mientras que en la secuencia del subtipo A del HVH-8 relacionado con la efusión peritoneal en (Cub 275LA/11) se encontró una mayor variabilidad con cambios de Q96T, Q97E, L101F, G102P y N246D. Las secuencias Cub 296/09 y Cub 50GL/09 pertenecientes al mismo paciente se agruparon en la misma rama del árbol filogenético como subtipo C ($p= 0.032$). Sin embargo mediante la inspección visual del alineamiento se reconocieron algunas diferencias a nivel aa. Cub 296/09 tuvo un cambio de L269I, mientras que Cub 50GL/09 mostró los siguientes cambios: G191A, L197S, L213I, P254H. Varios autores han descrito la variabilidad genética del HVH-8 (477, 502, 503). Los estudios filogenéticos indican que los subtipos de este HVs exhiben una variabilidad a nivel nucleotídico menor del 0.4%, considerándosele un virus muy conservado (504). Por el contrario, el análisis de las secuencias del gen ORF-K1 demuestra que en este gen se pueden producir hasta el 30% de cambios a nivel aa, con lo que se denota su amplia diversidad genética. La variabilidad de este



fragmento puede compararse con la que presenta la proteína de envoltura del VIH-1 (182). El gen ORF-K1 se ubica en el extremo izquierdo del genoma del HVH-8 y codifica una proteína de membrana de tipo 1 (505). Posee dos segmentos que se reconocen como regiones variables 1 y 2 localizadas en dos dominios extracelulares (RV1 y RV2), en las que se concentra su variabilidad nucleotídica (182). Aunque todavía no se ha comprobado, se piensa que dichas variaciones se producen por selección positiva. En este fenómeno evolutivo los cambios nucleotídicos no sinónimos superan los cambios sinónimos que producen alteraciones marcadas en la secuencia aminoacídica (506). Sin embargo, no se ha comprobado el efecto biológico de dichos cambios en la capacidad transformante y la traducción de señales de la proteína K1.

En otras regiones del genoma también se han encontrado sitios variables (507), y se ha demostrado que a través de la sustitución aminoacídica (aa 31 y 34) en el motivo LXXLL del gen Kaposin se obtiene en cultivo de células una proteína Kaposin sin capacidad transformante (508). No obstante, no se puede pasar por alto el posible efecto de los errores de la Enzima Taq Polimerasa durante el PCR (507). Por tanto, en futuras investigaciones habría que evaluar si las variaciones identificadas en el presente estudio impactan en las oncogénesis que induce la proteína K1 o si sólo traducen la acumulación de cambios aa en el intento por evadir la respuesta inmune del hospedero.

Por primera vez se asocia la infección por el subtipo A5 del HVH-8 en pacientes con diagnóstico histopatológico de linfadenopatías relacionadas con el SIDA. La CV del HVH-8 en el ganglio linfático de ambos pacientes estuvo por debajo de las 500 copias/100 ng de ADN, en los que también se amplificó el ADN del VEB (Cub 1GL/09 CV del HVH-8: 79 copias/100 ng de ADN y CV del VEB: 90 copias/100 ng de ADN ; Cub 62GL/09 CV del HVH-8: 495 copias/100 ng de ADN y CV: VEB 200 copias/100ng ADN). Los valores de CV del HVH-8 son inferiores a los detectados en el resto de las patologías en las que se identificó su ADN. En el ganglio linfático de ambos pacientes no se encontró evidencias histopatológicas de transformación celular. Además, el diagnóstico de la infección por el VIH se realizó poco tiempo antes de la identificación del Síndrome Adénico, por lo que se refuerza el diagnóstico de infección primaria por el HVH-8 referida en acápites previos. El seguimiento clínico de estos pacientes permitirá conocer la evolución de la infección por este agente.

Se ha especulado sobre la importancia que tienen los factores virales en el desarrollo del SK, aunque su efecto se ha explorado poco. No se han encontrado evidencias contundentes sobre la variación en la virulencia entre los subtipos del HVH-8 que circulan al mismo tiempo (341). De cualquier forma el efecto de los factores virales necesitan de mayor exploración. En concordancia



con otros autores (507, 509), no se encontró asociación significativa entre los subtipos del HVH-8 con el conteo de linfocitos T CD4+, la CV del VIH, el sexo, la edad, la orientación sexual y los estadios histológicos del SK-SIDA. Tampoco hubo diferencias significativas en los valores de la CV del HVH-8 entre los subtipos de este agente ($p=0.398$) (Figura IV.16).

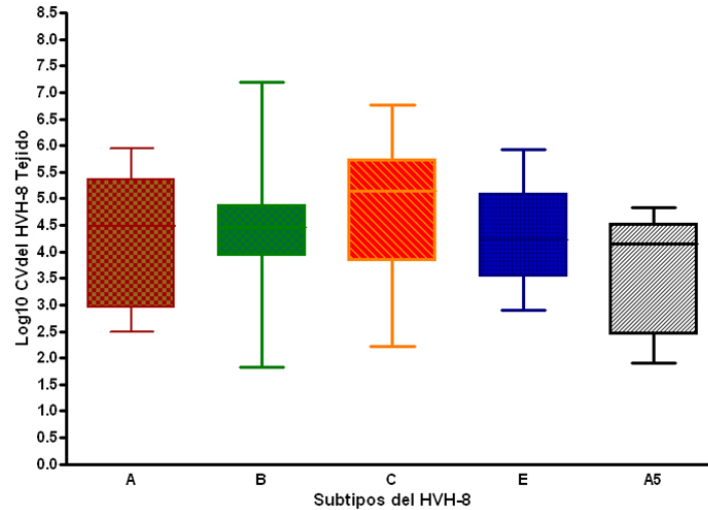


Figura IV.16. Logaritmo de la CV del HVH-8 detectada mediante qRT-PCR en muestras clínicas de individuos cubanos seropositivos al VIH-1 infectados con diferentes subtipos del HVH-8 (2005-2011).

Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en el número de copias del ADN del HVH-8 entre los distintos compartimentos en los que se detectó su infección ($p=0.000$) (Figura IV.17). Así se pudo identificar que la media de la CV del HVH-8 en el líquido de la efusión de los pacientes con diagnóstico de LEP fue superior a la que se detectó en el tejido de pacientes con SK-SIDA y en aquellos con diferentes patologías en el ganglio linfático. Por lo que se comprueba que la CV del HVH-8 constituye un marcador importante en el monitoreo de las enfermedades asociadas con su infección.

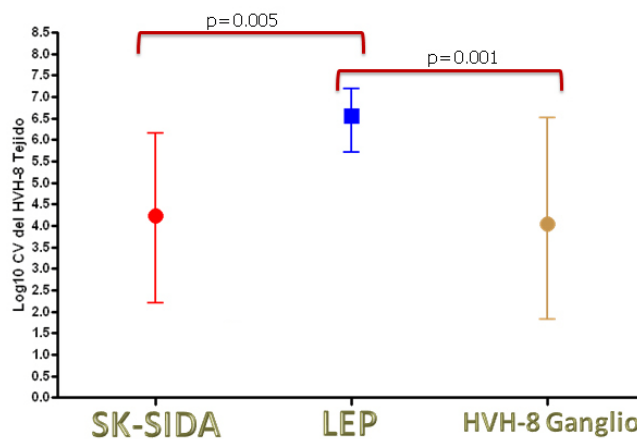


Figura IV.17. Logaritmo de la CV del HVH-8 detectada mediante qRT-PCR del gen ORF-26 en muestras clínicas de pacientes con diferentes patologías asociadas con este agente (2005-2011).



Gracias al qRT-PCR se ha conocido que existen diferencias en los valores de CV del HVH-8 entre las enfermedades con las que se ha asociado su infección en diferentes sitios anatómicos. En concordancia con los resultados obtenidos en el actual estudio, otros investigadores identificaron que la CV del HVH-8 es mayor en la efusión de los pacientes con LEP. No obstante, los valores en las CMSP de pacientes con EMC es superior al que se detecta en las CMSP de pacientes con LEP, pero los valores de éstas últimas superan a los encontrados en CMSP de individuos con SK (272, 510, 511). A partir de estos hallazgos se reconoce a la CV del HVH-8 como un marcador virológico importante para diferenciar cada una de estas patologías, sobre todo en aquellos pacientes con SK previo en los que se sospecha la aparición del LEP o la EMC. Además, estos resultados podrían señalar la existencia de características específicas del HVH-8 que le permiten mantenerse, replicarse y transformar diferentes células dianas para producir procesos linfoproliferativos, SK o la EMC. Hasta el momento, estas diferencias no se han podido determinar (512).

IV.5 Consideraciones generales

Las investigaciones que se agrupan en el presente estudio permitieron conocer el comportamiento de la infección por HVs en algunas de las patologías que causan en individuos seropositivos al VIH-1 en la era post-TARVAE en Cuba. No sólo como agentes causales de procesos agudos infecciosos a nivel del SNC (SNI) y en el ganglio linfático (LR, LG), sino como agentes involucrados en la oncogénesis de diferentes neoplasias (SK-SIDA, LNH, LH, LEP) relacionadas con la infección por los Gammaherpesvirus.

En primer lugar se evidenció la participación de los HVs en la infección del SNC de individuos cubanos infectados por el VIH. En ellos, el uso de la terapia antirretroviral no los excluye como posibles agentes implicados en su morbilidad. No obstante, se observó que es más común que aquellos individuos que reciben TARVAE tengan una mejor recuperación de la infección del SNC por HVs, que aquellos que no la reciben. Sin embargo, la influencia de la TARVAE en la incidencia del SNI por HVs tendría que evaluarse en estudios futuros. La PCR anidada múltiple para la detección de HVs en el LCR probó ser una herramienta diagnóstica muy útil en el diagnóstico de su infección a nivel del SNC. Esta técnica permitió reconocer la participación de uno o varios HVs en el SNI de individuos seropositivos al VIH-1. No obstante, por los resultados obtenidos en los estudios en los que se evaluó el valor de la CV de los HVs linfotropos habría que investigar en el futuro próximo su utilidad en el manejo del SNI por HVs en población VIH cubana.

Asimismo, se normalizó un protocolo de qRT-PCR rápido, específico y altamente sensible para determinar la CV del HVH-8. Su incorporación al flujograma diagnóstico del Laboratorio de ITS del



Departamento de Virología significará en un salto cualitativo no solo para el diagnóstico de la infección por este HVs, sino también en el monitoreo de la respuesta terapéutica y en estudios de la patogenia de su infección. Se comprobó además que la plataforma *LightCycler* constituye un sistema muy seguro que reduce el riesgo de contaminaciones y permite obtener los resultados en poco tiempo.

Por primera vez se demostró el papel de la infección sistémica en la oncogénesis asociada al HVH-8, confirmándose la presencia del virus en diferentes compartimentos de un mismo individuo con o sin diagnóstico de SK-SIDA. Además se demostró la participación del VEB en los linfomas que aparecen en individuos seropositivos al VIH-1. Uno de los aspectos más enigmáticos del estudio de la infección por estos patógenos latentes radica en discernir entre la detección de su genoma en células latentemente infectadas de aquel que se encuentra en células que soportan su replicación lítica. Para ello se han llevado a cabo estudios que emplean qRT-PCR para cuantificar el genoma de HVs, comprobándose que no es suficiente demostrar su presencia en determinadas muestras clínicas sino que se precisa definir la cuantía de dicha detección. Esta constituye una vía que permite definir su participación en la enfermedad que se investiga. De esta forma se han obtenido evidencias importantes sobre el conocimiento de mecanismos por los que los HVs establecen su infección en el hospedero, resaltándose la limitación de los ensayos serológicos en su diagnóstico. No solo por la elevada seroprevalencia que estos patógenos son capaces de producir, sino por las limitaciones inherentes a los ensayos inmunoenzimáticos. Además, los ensayos serológicos son de poca utilidad en individuos con sistema inmune deteriorado pues en ocasiones éstos no logran establecer una respuesta adecuada de Acs.

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran la utilidad del qRT-PCR en el estudio de la infección por patógenos latentes. En primer lugar, permitió demostrar que el HVH-8 es capaz de producir una infección sistémica en pacientes con SK-SIDA. Dicha infección es un proceso dinámico y complejo, en el que se involucran varios fluidos y células del hospedero infectado (Figura IV.18).

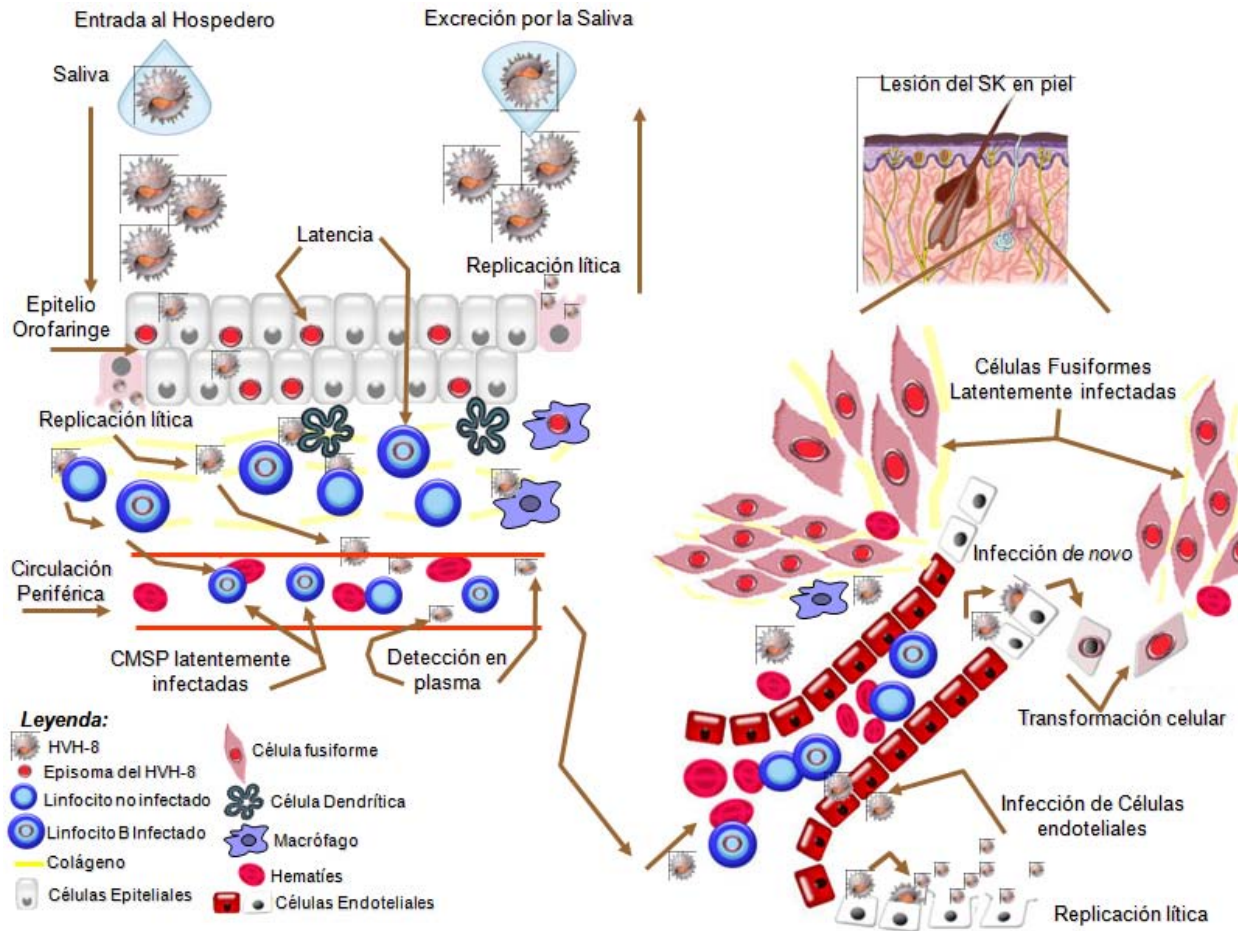


Figura IV.18. Modelo de la patogenia de la infección por el HVH-8.

Proponemos que el contacto de un individuo susceptible con la saliva de un paciente con SK-SIDA, en el que se detecta elevado número de copias del ADN del HVH-8, garantiza la adquisición de este HVs. El contacto de la partícula viral con el epitelio de la mucosa favorece el establecimiento de su infección, incluso de los linfocitos B y otras células efectoras de la respuesta inmunitaria innata (macrófagos, células NK, células dendríticas) que pueden transportarlo hasta los centros germinales de los ganglios linfáticos. El intercambio de saliva puede ocurrir no sólo en el transcurso de una relación sexual, sino a través de la convivencia en el mismo domicilio con un individuo infectado. No obstante, habría que definir las prácticas sexuales, los factores de favorecen la transmisión horizontal del HVH-8 así como el tiempo de exposición necesario para establecerse en el hospedero.

El HVH-8 entonces establece su infección latente en las células del epitelio mucoso con lo que garantiza no sólo su persistencia en el hospedero, sino la evasión de la respuesta inmune. Sin embargo, por la CV que se detectó en la saliva se sugiere que este agente es capaz de lograr progenie viral mediante ciclos de replicación activa en las células epiteliales. Con ello el HVH-8



garantiza su excreción a través de la saliva e incluso la infección de nuevas células permisivas. Por supuesto que esta replicación ocurriría con menor intensidad que la que tiene lugar a nivel de la lesión, ya que el número de copias que se detectó en las muestras de saliva fue significativamente inferior.

Los linfocitos B que resultaron infectados tras su paso por la cavidad oral serán la vía principal que le permitirá al virus circular en la sangre periférica en su estado latente, hasta que se reúnan las condiciones idóneas para establecer la transformación celular en algún sitio anatómico. Esto justifica la detección del ADN del HVH-8 en las CMSP en los individuos infectados de forma asintomática (contactos). La coexistencia de algunos factores sistémicos y locales (coinfección con el VIH y con otros HVs, inmunodepresión, factores genéticos, hipoxia tisular) en el hospedero permitirán el establecimiento de la infección en las células endoteliales; no sólo a nivel de la piel, sino también a nivel de otros órganos diana: membranas mucosas, ganglio linfático, pulmón, tracto gastrointestinal.

Entonces, los valores de CV que se detectan en el sitio del tumor traducen no sólo la amplificación del genoma del HVH-8 en células latentemente infectadas, sino que de forma simultánea en algunas células endoteliales este agente establece su replicación lítica. Esto le permite infectar a nuevas células endoteliales y otras células del sistema inmune a medida que progresa la lesión. Estos ciclos de replicación lítica podrían tener lugar de forma recurrente, con lo que se justificaría la presencia intermitente de un escaso número de copias de ADN del virus en las muestras de plasma. No obstante, durante la infección activa a nivel de la orofaringe también se puede producir el paso de un escaso número de partículas virales a la circulación general, su papel en la patogenia de la infección habría que definirlo.

Los resultados obtenidos obligan a la reflexión sobre algunos aspectos que abren nuevas interrogantes a las que hasta el momento no se ha encontrado una respuesta plausible y categórica. Hasta qué punto los valores inferiores de CV del HVH-8 que se detectaron en saliva, CMSP y plasma con respecto a los encontrados en tejido representan la existencia de un programa único de latencia caracterizado por un escaso número de copias del genoma viral por célula. En caso de ser así, cuáles serían entonces los mecanismos involucrados en la regulación de esta estrategia replicativa que permite establecer diferencias entre los sitios anatómicos más distantes.

Se corroboró que en Cuba circulan varios subtipos del HVH-8, pero se comprobó que existe un aumento en la frecuencia de identificación de pacientes infectados con subtipos B, el que no sólo es capaz de participar en la oncogénesis del SK-SIDA, sino en otros procesos linfoproliferativos.



Los subtipos más frecuentes son los que progresan hacia la enfermedad asociada con la infección por HVH-8 alrededor de los tres años de diagnosticada la infección por el VIH. Se sugiere que el subtipo E se asocia con el SK-SIDA y el subtipo A5 se relacionó de forma significativa con las linfadenopatías relacionadas con el SIDA. A pesar de que se identificaron algunas variaciones en la secuencia aa de diferentes aislamientos del HVH-8, su impacto en la transformación celular y transmisión de este agente deberá evaluarse en investigaciones futuras. Éstas pueden ser el resultado del mecanismo adaptativo del HVH-8 con vistas a evadir la presión selectiva del sistema inmune. No obstante, todos estos hallazgos resaltan la importancia del monitoreo de la infección por este agente no sólo en población VIH, sino en población general con vistas a tener una visión real de la prevalencia de su infección en Cuba.

El estudio sobre la participación de los HVs linfotropos en el Síndrome Adénico permitió conocer, por primera vez, la frecuencia con que se identifica el genoma de estos agentes en el ganglio linfático y saliva de estos pacientes. Así fue que se reconoció que el VEB es el HVs más frecuente en ganglio y saliva, aunque son comunes las coinfecciones. Se pudo comprobar que el diagnóstico serológico no permitió llegar al diagnóstico nosológico del Síndrome. Sin embargo, la CV de estos HVs permitió demostrar que el HVH-6 y el CMVh no tienen una participación activa en dicho Síndrome. También se identificó que la CV del VEB en ganglio linfático puede considerarse un marcador tumoral; mientras que la CV del HVH-8 en ganglio y saliva es útil para reconocer la participación de este agente en el Síndrome Adénico. Finalmente se comprobó que la CV de HVs linfotropos en ganglio linfático y saliva constituyen marcadores que permiten diferenciar el tipo de infección latente/lítica de estos patógenos en ambos compartimentos.

Un hallazgo común en las patologías que se abordaron en el presente estudio fue la identificación de coinfecciones no sólo entre varios HVs sino con otros patógenos no virales. Esto demuestra que las infecciones por varios microorganismos pueden ocurrir en individuos con deterioro de la respuesta inmune, entre las que deben existir interacciones que le permiten colonizar, persistir, reactivarse e incluso transformar células. Este efecto colaborador habrá que definirlo en el futuro próximo, por lo que el diagnóstico de la infección debe tener un enfoque integrador según el síndrome clínico que se esté estudiando.

Por otra parte, la saliva de pacientes seropositivos al VIH-1 con diferentes patologías probó ser una importante vía por la que se excretan los HVs linfotropos. Si se pretende limitar su transmisión, es importante identificar no sólo la frecuencia de excreción sino la magnitud de su presencia en este fluido. Este constituye un paso primordial para evaluar su posible impacto no



sólo en otros individuos VIH sino en población general que mantienen contacto con estos pacientes.

Finalmente, las diferencias que se detectaron en la CV de los HVs estudiados denotan la existencia de mecanismos específicos de control de la infección por parte de los efectores de la respuesta inmune en sitios anatómicos distantes. De esta forma en la cavidad oral de los individuos seropositivos al VIH-1 estos agentes en ocasiones son capaces de burlar la acción de la respuesta inmune. Así logran obtener una progenie viral que garantizará no sólo la perpetuación de su especie en la naturaleza a través de su paso a un hospedero susceptible, sino en el propio hospedero mediante la infección de nuevas células diana. Su paso a los ganglios linfáticos que drenan los sitios de entrada constituyen la vía por la que pueden llegar a infectar a otras células susceptibles del sistema inmune o de burlar la inmunovigilancia y establecer la transformación neoplásica. Aquellos que logran vencer esta línea de defensa son transportados hacia los tejidos mediante las células latentemente infectadas del propio sistema inmune. Una vez en los tejidos, se pueden producir varios eventos, en dependencia de la capacidad de la respuesta inmune local de limitar o no su replicación. Entonces, si encuentran las condiciones idóneas pueden establecer una infección aguda con estigmas clínicos de daño tisular (SNI, LR). Por el contrario, pueden establecer ciclos repetitivos de replicación que le permiten crear las condiciones locales no sólo para evadir la respuesta inmune, sino para modificarla en beneficio propio y así lograr establecer la oncogénesis (SK-SIDA). En el tumor, pueden llegar a limitar la capacidad efectora de las células del sistema inmune independientemente de su competencia en la circulación periférica. De esta forma, se resalta la importancia del reconocimiento de los mediadores de la respuesta inmune que resultan diana de la acción de estos agentes en distintos sitios anatómicos. Ello permitirá comprender la patogenia de su infección y definir las medidas necesarias para el control de las enfermedades que los HVs causan en el hospedero inmunocomprometido.



V. CONCLUSIONES

- Los HVs que con mayor frecuencia producen SNI en individuos cubanos seropositivos al VIH-1 son el CMVh y el VEB, aunque son frecuentes las coinfecciones por HVs.
- No existe asociación entre la infección del SNC por HVs y el comportamiento clínico-epidemiológico del SNI en individuos seropositivos al VIH-1, reafirmando la importancia del diagnóstico virológico en el manejo de los mismos.
- La frecuencia de Acs contra el VEB, CMVh y HVH-6 es elevada en individuos seropositivos al VIH-1, su determinación no permite identificar el diagnóstico definitivo de la enfermedad causante del Síndrome Adénico.
- El VEB es el HVs linfotrofo más frecuente en ganglio linfático y saliva de pacientes seropositivos al VIH con Síndrome Adénico, aunque son comunes las coinfecciones; demostrándose que no es frecuente la infección por CMVh y HVH-6 en esta patología.
- La CV de HVs linfotropos en ganglio linfático y saliva constituyen marcadores que permiten diferenciar el tipo de infección latente/lítica de estos patógenos en ambos compartimentos.
- La CV del VEB en el ganglio linfático y del HVH-8 en saliva puede constituir marcadores útiles en el diagnóstico nosológico del Síndrome Adénico de pacientes seropositivos al VIH-1.
- Es frecuente detectar simultáneamente el ADN del HVH-8 en diferentes fluidos y células tanto de pacientes con SK-SIDA como en sus contactos, con lo que se demuestra el efecto de la infección viral sistémica en la oncogénesis por este agente.
- No existe asociación entre la CV del HVH-8 con los estadios histopatológicos del SK pero los HSH poseen mayor riesgo de infección por este agente incluso de desarrollar un SK con alta carga viral en el tumor.
- Se confirma que en Cuba circulan varios subtipos del HVH-8 en adultos seropositivos al VIH-1 observándose un incremento en la frecuencia del subtipo africano B.



-
- Los subtipos del HVH-8 no se asocian con patologías específicas pero su CV sí permite identificar que existen diferencias en la estrategia replicativa de este agente en las enfermedades que este virus tumoral produce.



VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la introducción del diagnóstico mediante PCR en tiempo real de la infección del SNC por HVs en pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI en Cuba.
- Realizar estudio de seroprevalencia de infección del HVH-8 en población general.
- Introducir la CV del VEB y HVH-8 en el diagnóstico diferencial del Síndrome Adénico de pacientes seropositivos al VIH-1.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roizman B, Pellet PE. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe D.M; Howley P.M.; Griffin D.E; Lamb RAM, MA; Roizman, B.; Straus, S.E., editor. *Fields Virology*. 4th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2001. p. 2803-33.
2. Pozo F, Tenorio A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1999 Apr;79(1):9-19.
3. Griffin E, Krantz E, Selke S, Huang ML, Wald A. Oral mucosal reactivation rates of herpesviruses among HIV-1 seropositive persons. *J Med Virol*. 2008 Jul;80(7):1153-9.
4. Miller CS, Danaher RJ. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus (HSV) in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Jan;105(1):43-50.
5. Mehta SK, Tying SK, Gilden DH, Cohrs RJ, Leal MJ, Castro VA, et al. Varicella-zoster virus in the saliva of patients with herpes zoster. *J Infect Dis*. 2008 Mar 1;197(5):654-7.
6. ONUSIDA. Global Report, UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC, 2010. 2010 [updated 2010 2010; cited 2011 9]; Available from: http://www.unaids.org/globalreport/default_es.htm.
7. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1213-24.
8. Price RW, Spudich S. Antiretroviral therapy and central nervous system HIV type 1 infection. *J Infect Dis*. 2008 May 15;197 Suppl 3:S294-306.
9. Mamidi A, DeSimone JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol*. 2002 Jun;8(3):158-67.
10. Richner S, Laifer G. Peripheral lymphadenopathy in immunocompetent adults. *Swiss Med Wkly*. 2010 Feb 20;140(7-8):98-104.
11. Oksenhendler E, Cazals-Hatem D, Schulz TF, Barateau V, Grollet L, Sheldon J, et al. 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 May 28;338(22):1585-90.
12. Stebbing J, Pantanowitz L, Dayyani F, Sullivan RJ, Bower M, Dezube BJ. HIV-associated multicentric Castleman's disease. *Am J Hematol*. 2008 Jun;83(6):498-503.
13. Tanaka N. [Infection of herpes simplex virus (HSV) and Epstein-Barr virus (EBV) in acute tonsillitis--histopathological assessment by optical and electron microscopic observation of biopsy specimens of tonsils]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 2001 Nov;104(11):1093-102.
14. Tsaparas YF, Brigden ML, Mathias R, Thomas E, Raboud J, Doyle PW. Proportion positive for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6, Toxoplasma, and human immunodeficiency virus types 1 and 2 in heterophile-negative patients with an absolute lymphocytosis or an instrument-generated atypical lymphocyte flag. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Sep;124(9):1324-30.
15. Lederman MM, Margolis L. The lymph node in HIV pathogenesis. *Semin Immunol*. 2009 Jun;20(3):187-95.
16. Ramsay AD. Reactive lymph nodes in pediatric practice. *Am J Clin Pathol*. 2004 Dec;122 Suppl:S87-97.
17. Morris MA, Young LS, Dawson CW. DNA tumour viruses promote tumour cell invasion and metastasis by deregulating the normal processes of cell adhesion and motility. *Eur J Cell Biol*. 2008 Sep;87(8-9):677-97.
18. Wang L, Damania B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus confers a survival advantage to endothelial cells. *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4640-8.
19. Samati L, Babudieri S, Longo B, Stamini G, Carbonara S, Monarca R, et al. Human herpesvirus 8 and human herpesvirus 2 infections in prison population. *J Med Virol*. 2007 Feb;79(2):167-73.
20. Eltom MA, Mbulaiteye SM, Dada AJ, Whitby D, Biggar RJ. Transmission of human herpesvirus 8 by sexual activity among adults in Lagos, Nigeria. *Aids*. 2002 Dec 6;16(18):2473-8.
21. Drago F, Rebera A. Human herpesvirus as a sexually transmitted agent. *Lancet*. 2001 Jan 27;357(9252):307.



22. Malope BI, MacPhail P, Mbisa G, MacPhail C, Stein L, Ratshikhopha EM, et al. No evidence of sexual transmission of Kaposi's sarcoma herpes virus in a heterosexual South African population. *Aids*. 2008 Feb 19;22(4):519-26.
23. Lebbe C. [Human herpesvirus 8 (HHV-8) and Kaposi sarcoma.]. *Hautarzt*. 2008 Jan;59(1):18-25.
24. Pica F, Volpi A. Transmission of human herpesvirus 8: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 2007 Apr;20(2):152-6.
25. Zhang Y, Peng J, Tang Y, He J, Zhao Q, He R, et al. The prevalence of Epstein-Barr virus infection in different types and sites of lymphomas. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Mar;63(2):132-5.
26. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. The global burden of cancer: priorities for prevention. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):100-10.
27. Smith MV, Miller CR, Kohn M, Walker NJ, Portier CJ. Absolute estimation of initial concentrations of amplicon in a real-time RT-PCR process. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:409.
28. Compston LI, Sarkobie F, Li C, Candotti D, Opare-Sem O, Allain JP. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of latent and persistent viral genomes in cellular or plasma blood fractions. *J Virol Methods*. 2008 Jul;151(1):47-54.
29. Fujimuro M, Nakaso K, Nakashima K, Sadanari H, Hisanori I, Teishikata Y, et al. Multiplex PCR-based DNA array for simultaneous detection of three human herpesviruses, EVB, CMV and KSHV. *Exp Mol Pathol*. 2006 Apr;80(2):124-31.
30. Crawford JR. Advances in pediatric neurovirology. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2010 Mar;10(2):147-54.
31. Bakker NA, Verschuuren EA, Veeger NJ, van der Bij W, van Imhoff GW, Kallenberg CG, et al. Quantification of Epstein-Barr virus-DNA load in lung transplant recipients: a comparison of plasma versus whole blood. *J Heart Lung Transplant*. 2008 Jan;27(1):7-10.
32. 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 Dec;39(12):4269-73.
33. Parisi SG, Cruciani M, Palu G. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2007 Jan 4;356(1):87; author reply 9.
34. Drago L, Lombardi A, De Vecchi E, Giuliani G, Bartolone R, Gismondo MR. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect Dis*. 2004 Nov 30;4:55.
35. Pérez J, Pérez D, Gonzalez I, DiazJidy M, Orta M, Aragonés C, et al. Approaches to the Management Of HIV/AIDS in Cuba: Case Study. *Medicc Review*. 2005;7(7):1-13.
36. Kouri V, Marini A, Nambiar S, Rodriguez ME, Capo V, Resik S, et al. Nearly identical strains of human herpesvirus 8 in couples discordant for Kaposi's sarcoma. *Aids*. 2007 Mar 30;21(6):765-8.
37. Kouri V, Marini A, Doroudi R, Nambiar S, Rodriguez ME, Capo V, et al. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's sarcoma (KS) and asymptomatic sexual contacts. *Virology*. 2005 Jul 5;337(2):297-303.
38. Kouri V, Liang X, Rodriguez ME, Capo V, Resik S, Barrios J, et al. Molecular epidemiology and KSHV K1 subtypes in a Cuban AIDS-Kaposi's sarcoma population. *Aids*. 2005 Jun 10;19(9):984-7.
39. Davison AJ. Overview of classification. In: Arvin A, Campadelli Fiume G, Mocarski ES, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
40. Roizman B. The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*. 1979 Mar;16(3):481-94.
41. Ejercito PM, Kieff ED, Roizman B. Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol*. 1968 May;2(3):357-64.
42. Marconi P, Argnani R, Berto E, Epstein AL, Manservigi R. HSV as a vector in vaccine development and gene therapy. *Hum Vaccin*. 2008 Mar-Apr;4(2):91-105.
43. Vancikova Z, Dvorak P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals—a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2001 Aug;1(2):179-87.



44. Lebbe C. [Humanes herpesvirus 8 (HHV-8) and Kaposi sarcoma]. *Hautarzt*. 2008 Jan;59(1):18-25.
45. Epstein MA. Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J Cell Biol*. 1962 Mar;12:589-97.
46. Falke D. [Milestones in virology]. *Immun Infekt*. 1993 Jun;21(3):69-74.
47. Armstrong JA, Pereira HG, Andrewes CH. Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the Herpesvirus group. *Virology*. 1961 Jun;14:276-85.
48. Nii S, Morgan C, Rose HM, Hsu KC. Electron microscopy of herpes simplex virus. IV. Studies with ferritin-conjugated antibodies. *J Virol*. 1968 Oct;2(10):1172-84.
49. Watson DH, Russell WC, Wildy P. Electron microscopic particle counts on herpes virus using the phosphotungstate negative staining technique. *Virology*. 1963 Mar;19:250-60.
50. Roizman B, Knipe DM, Whitley R. Herpes simplex viruses. In: P.M. KDMH, editor. *Fields Virology*. 5th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2007. p. 2503-601.
51. Dai W, Jia Q, Bortz E, Shah S, Liu J, Atanasov I, et al. Unique structures in a tumor herpesvirus revealed by cryo-electron tomography and microscopy. *J Struct Biol*. 2008 Mar;161(3):428-38.
52. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol*. 2011 May;9(5):369-81.
53. McCombs RM, Brunschwig JP, Mirkovic R, Benyesh-Melnick M. Electron microscopic characterization of a herpeslike virus isolated from tree shrews. *Virology*. 1971 Sep;45(3):816-20.
54. Liu F, Hong Z. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli Fiume G, Mocarski ES, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
55. Booy FP, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC, Baker TS, Steven AC. Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell*. 1991 Mar 8;64(5):1007-15.
56. Gibson W, Roizman B. The structural and metabolic involvement of polyamines with herpes simplex virus. In: Russell D, editor. *Polyamines in normal and neoplastic growth*. New York: Raven Press; 1973. p. 123-35.
57. Markovitz NS, Filatov F, Roizman B. The U(L)3 protein of herpes simplex virus 1 is translated predominantly from the second in-frame methionine codon and is subject to at least two posttranslational modifications. *J Virol*. 1999 Oct;73(10):8010-8.
58. Mavromara-Nazos P, Roizman B. Delineation of regulatory domains of early (beta) and late (gamma 2) genes by construction of chimeric genes expressed in herpes simplex virus 1 genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun;86(11):4071-5.
59. Davison AJ. Comparative analysis of the genomes. In: Arvin A, Campadelli Fiume G, Mocarski ES, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
60. Mocarski ES. Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In: Arvin A, Campadelli Fiume G, Mocarski ES, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
61. Adams A, Bjursell G, Kaschka-Dierich C, Lindahl T. Circular Epstein-Barr virus genomes of reduced size in a human lymphoid cell line of infectious mononucleosis origin. *J Virol*. 1977 May;22(2):373-80.
62. Mellerick DM, Fraser NW. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology*. 1987 Jun;158(2):265-75.
63. Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Sakane-Ishikawa F, Wada N, Aozasa K. Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):967-74.
64. Luo WJ, Takakuwa T, Ham MF, Wada N, Liu A, Fujita S, et al. Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab Invest*. 2004 Sep;84(9):1193-9.
65. Rickinson A, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: P.M. KDMH, editor. *Fields Virology*. 5th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2007. p. 2657-700.



66. Komaroff AL, Jacobson S, Ablashi DV, Yamanishi K. Highlights from 5th International Conference on HHV-6 and -7. *Herpes*. 2006 Nov;13(3):81-2.
67. Jones PC, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J Virol*. 1979 Aug;31(2):299-314.
68. Ben-Porat T, Tokazewski SA. Replication of herpesvirus DNA. II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA. *Virology*. 1977 Jun 15;79(2):292-301.
69. Yasuda A, Noguchi K, Minoshima M, Kashiwazaki G, Kanda T, Katayama K, et al. DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. *Cancer Sci*. 2011 Sep 12.
70. Caliskan M, Cusanovich DA, Ober C, Gilad Y. The effects of EBV transformation on gene expression levels and methylation profiles. *Hum Mol Genet*. 2011 Feb 16.
71. Gupta S, Agrawal S, Gollapudi S. Differential effect of human herpesvirus 6A on cell division and apoptosis among naive and central and effector memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets. *J Virol*. 2009 Jun;83(11):5442-50.
72. Ward PL, Roizman B. Evasion and obstruction: The central strategy of the interaction of human herpesviruses with host defenses. In: Freidman H, Medveczky P, Bendinelli M, editors. *Molecular Immunology of Herpesviruses*. New York: Plenum Press; 1998. p. 1-32.
73. Fuse S, Molloy MJ, Usherwood EJ. Immune responses against persistent viral infections: possible avenues for immunotherapeutic interventions. *Crit Rev Immunol*. 2008;28(2):159-83.
74. Strenger V, Urban C, Schwinger W, Nacheva EP, Aberle SW. Transmission of chromosomally integrated HHV-6 by bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan;56(1):171.
75. Lisco A, Munawwar A, Introini A, Vanpouille C, Saba E, Feng X, et al. Semen of HIV-1-Infected Individuals: Local Shedding of Herpesviruses and Reprogrammed Cytokine Network. *J Infect Dis*. 2011 Nov 22.
76. Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti AB, Martins ML, Lopes da Silva SN, Ribeiro M, et al. Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals*. 2009 Apr;37(2):71-7.
77. Wyatt LS, Frenkel N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol*. 1992 May;66(5):3206-9.
78. Chang RS, Lewis JP, Abildgaard CF. Prevalence of oropharyngeal excretors of leukocyte-transforming agents among a human population. *N Engl J Med*. 1973 Dec 20;289(25):1325-9.
79. Vanitha DJ, Joo HM, Rouse BT, Sangster MY. Quantitative analysis of herpes simplex virus type 1-specific memory B cells generated by different routes of infection. *Virology*. 2007 Mar 30;360(1):136-42.
80. Aiello AE, Simanek AM, Galea S. Population levels of psychological stress, herpesvirus reactivation and HIV. *AIDS Behav*. 2010 Apr;14(2):308-17.
81. Matsuzaki A, Suminoe A, Koga Y, Kusuvara K, Hara T, Ogata R, et al. Fatal visceral varicella-zoster virus infection without skin involvement in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008 Apr-May;25(3):237-42.
82. Sawyer MH, Chamberlin CJ, Wu YN, Aintablian N, Wallace MR. Detection of Varicella-Zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *J Infect Dis*. 1994;169(1):91-4.
83. Boucher FD, Yasukawa LL, Bronzan RN, Hensleigh PA, Arvin AM, Prober CG. A prospective evaluation of primary genital herpes simplex virus type 2 infections acquired during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J*. 1990 Jul;9(7):499-504.
84. Schonberger S, Meisel R, Adams O, Pufal Y, Laws HJ, Enczmann J, et al. Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Oct;16(10):1428-35.
85. Mocarski ES, Shenk T, Pass R. Cytomegaloviruses. In: P.M. KDMH, editor. *Fields Virology*. 5th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2007. p. 2703-72.
86. Smith JM, Corey L, Bittner R, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, et al. Subclinical viremia increases risk for chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Sep;21(9):1579-86.



87. Tabatabaee M, Tayyebi D. Seroepidemiologic study of human cytomegalovirus in pregnant women in Valiasr Hospital of Kazeroon, Fars, Iran. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009 Jun;22(6):517-21.
88. Granstrom M, Leinikki P, Santavuori P, Pettay O. Perinatal cytomegalovirus infection in man. *Arch Dis Child.* 1977 May;52(5):354-9.
89. Henderson R, Carlin D, Kohlhase K, Leader S. Multicenter US study of hospital resource utilization associated with cytomegalovirus-related readmission of renal and heart transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 2001;3 Suppl 2:57-9.
90. Boppana SB, Fowler KB, Vaid Y, Hedlund G, Stagno S, Britt WJ, et al. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics.* 1997 Mar;99(3):409-14.
91. Holtappels R, Reddehase MJ. CD8 T cell-based immunotherapy of cytomegalovirus disease in the mouse model of the immunocompromised bone marrow transplant recipient. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control.* Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press; 2006. p. 383-418.
92. Vetsika EK, Callan M. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. *Expert Rev Mol Med.* 2004 Nov 5;6(23):1-16.
93. Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, Kryscio RJ. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2409-15.
94. Barin F. [Viruses and unconventional transmissible agents: update on transmission via blood]. *Transfus Clin Biol.* 2000 Jun;7 Suppl 1:5s-10s.
95. Rimar D, Rimar Y, Keynan Y. Human herpesvirus-8: beyond Kaposi's. *Isr Med Assoc J.* 2006 Jul;8(7):489-93.
96. Zavitsanou A, Sypsa V, Petrodaskalaki M, Kalapothaki V, Whitby D, Hatzakis A. Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in healthy urban employees from Greece: seroprevalence and associated factors. *J Med Virol.* 2007 May;79(5):591-6.
97. Machado DM, Sumita LM, Pannuti CS, Succi RC, Moraes-Pinto MI, Souza VA. Seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in children born to HIV-1-infected women in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Feb;38(2):237-40.
98. Sarmati L. HHV-8 infection in African children. *Herpes.* 2004 Aug;11(2):50-3.
99. Cook RD, Hodgson TA, Molyneux EM, Borgstein E, Porter SR, Teo CG. Tracking familial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus using restriction fragment length polymorphism analysis of latent nuclear antigen. *J Virol Methods.* 2002 Sep;105(2):297-303.
100. Alkharsah KR, Dedicoat M, Blasczyk R, Newton R, Schulz TF. Influence of HLA Alleles on Shedding of Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus in Saliva in an African Population. *J Infect Dis.* 2007 Mar 15;195(6):809-16.
101. Brayfield BP, Kankasa C, West JT, Muyanga J, Bhat G, Klaskala W, et al. Distribution of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in maternal saliva and breast milk in Zambia: implications for transmission. *J Infect Dis.* 2004 Jun 15;189(12):2260-70.
102. Dedicoat M, Newton R, Alkharsah KR, Sheldon J, Szabados I, Ndlovu B, et al. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *J Infect Dis.* 2004 Sep 15;190(6):1068-75.
103. Sarmati L, Carlo T, Rossella S, Montano M, Adalgisa P, Rezza G, et al. Human herpesvirus-8 infection in pregnancy and labor: lack of evidence of vertical transmission. *J Med Virol.* 2004 Mar;72(3):462-6.
104. Mbulaiteye S, Marshall V, Bagni RK, Wang CD, Mbisa G, Bakaki PM, et al. Molecular evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in Uganda and K1 gene evolution within the host. *J Infect Dis.* 2006 May 1;193(9):1250-7.
105. Lisco A, Barbierato M, Fiore JR, Gasperini P, Favia A, Volpe A, et al. Pregnancy and human herpesvirus 8 reactivation in human immunodeficiency virus type 1-infected women. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov;44(11):3863-71.



106. Henke-Gendo C, Schulz TF. Transmission and disease association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: recent developments. *Curr Opin Infect Dis.* 2004 Feb;17(1):53-7.
107. Lavreys L, Chohan B, Ashley R, Richardson BA, Corey L, Mandaliya K, et al. Human herpesvirus 8: seroprevalence and correlates in prostitutes in Mombasa, Kenya. *J Infect Dis.* 2003 Feb 1;187(3):359-63.
108. Mbulaiteye SM, Pfeiffer RM, Whitby D, Brubaker GR, Shao J, Biggar RJ. Human herpesvirus 8 infection within families in rural Tanzania. *J Infect Dis.* 2003 Jun 1;187(11):1780-5.
109. Baeten JM, Chohan BH, Lavreys L, Rakwar JP, Ashley R, Richardson BA, et al. Correlates of human herpesvirus 8 seropositivity among heterosexual men in Kenya. *Aids.* 2002 Oct 18;16(15):2073-8.
110. Plancoulaine S, Gessain A, van Beveren M, Tortevoeye P, Abel L. Evidence for a recessive major gene predisposing to human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in a population in which HHV-8 is endemic. *J Infect Dis.* 2003 Jun 15;187(12):1944-50.
111. Marcelin AG, Grandadam M, Flandre P, Nicand E, Milliancourt C, Koeck JL, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus and HIV-1 seroprevalences in prostitutes in Djibouti. *J Med Virol.* 2002 Oct;68(2):164-7.
112. Crum NF, Wallace MR, Stephan K, Blazes DL, Aronson N, Tasker SA, et al. Correlates of human herpesvirus-8 seropositivity among U.S. military members recently infected with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis.* 2003 Sep;30(9):713-8.
113. Hladik W, Dollard SC, Mermin J, Fowlkes AL, Downing R, Amin MM, et al. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med.* 2006 Sep 28;355(13):1331-8.
114. Bendsoe N, Dictor M, Blomberg J, Agren S, Merk K. Increased incidence of Kaposi sarcoma in Sweden before the AIDS epidemic. *Eur J Cancer.* 1990;26(6):699-702.
115. Velez-Garcia E, Robles-Cardona N, Fradera J. Kaposi's sarcoma in transfusion-associated AIDS. *N Engl J Med.* 1985 Mar 7;312(10):648.
116. Moore PS, Chang Y, Jaffe HW. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med.* 2007 Jan 4;356(1):88; author reply 9.
117. Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, Ablashi DV, Dollard SC, Forghani B, et al. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion.* 2003 Sep;43(9):1260-8.
118. Dollard SC, Nelson KE, Ness PM, Stambolis V, Kuehnert MJ, Pellett PE, et al. Possible transmission of human herpesvirus-8 by blood transfusion in a historical United States cohort. *Transfusion.* 2005 Apr;45(4):500-3.
119. Atkinson J, Edlin BR, Engels EA, Kral AH, Seal K, Gamache CJ, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 among injection drug users in San Francisco. *J Infect Dis.* 2003 Mar 15;187(6):974-81.
120. Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, et al. 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 Mar 1;344(9):637-43.
121. Renwick N, Dukers NH, Weverling GJ, Sheldon JA, Schulz TF, Prins M, et al. Risk factors for human herpesvirus 8 infection in a cohort of drug users in the Netherlands, 1985-1996. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1808-12.
122. Harwood AR, Osoba D, Hofstader SL, Goldstein MB, Cardella CJ, Holecek MJ, et al. Kaposi's sarcoma in recipients of renal transplants. *Am J Med.* 1979 Nov;67(5):759-65.
123. Marcelin AG, Calvez V, Dussaix E. KSHV after an organ transplant: should we screen? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;312:245-62.
124. Farge D, Lebbe C, Marjanovic Z, Tuppin P, Mouquet C, Peraldi MN, et al. 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 May 15;67(9):1236-42.
125. Barozzi P, Bosco R, Vallerini D, Potenza L, Torelli G, Luppi M, et al. KSHV/HHV-8 infection of tubular epithelial cells in transplantation kidney. *Transplantation.* 2006 Sep 27;82(6):851-2.
126. Cohen J, Straus S, Arvin AM. Varicella-Zoster Virus Replication, Pathogenesis, and Management. In: P.M. KDMH, editor. *Fields Virology.* 5th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2007. p. 2703-72.



127. Moore PS, Chang Y. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. In: Knipe D.M; Howley P.M.; Griffin D.E; Lamb RAM, MA; Roizman, B.; Straus, S.E., editor. *Fields Virology*. 4th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2001. p. 2803-33.
128. Yamanishi K, Mori Y, Pellett PE. Human Herpesviruses 6 and 7. In: P.M. KDMH, editor. *Fields Virology*. 5th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2007. p. 2703-72.
129. Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol*. 2011 Feb;83(2):322-30.
130. Wilson SS, Fakioglu E, Herold BC. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Jun;7(5):559-68.
131. Roos KL, Tyler KL. Meningitis, encefalitis, absceso encefálico y empiema. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 16 ed. ed. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España S.A.; 2005.
132. Llanio R, Perdomo G, Arús E. *Propedéutica Clínica y Semiológica Médica*. La Habana: Ecimed; 2005. p. 998 - 1000.
133. Gaeta A, Verzaro S, Cristina LM, Mancini C, Nazzari C. Diagnosis of neurological herpesvirus infections: real time PCR in cerebral spinal fluid analysis. *New Microbiol*. 2009 Oct;32(4):333-40.
134. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol*. 1984 Jun;19(6):917-9.
135. Rabella N, Drew WL. Comparison of conventional and shell vial cultures for detecting cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol*. 1990 Apr;28(4):806-7.
136. Zhou CF, Abe K, Wang P, Ojima T, Yamamoto K. Efficient propagation of human herpesvirus 6B in a T-cell line derived from a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Microbiol Immunol*. 1999;43(5):425-36.
137. Ganem D. Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus. In: P.M. KDMH, editor. *Fields Virology*. 5th. ed. USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2007. p. 2703-72.
138. Ganem D. KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest*. 2010 Apr 1;120(4):939-49.
139. Duus KM, Lentchitsky V, Wagenaar T, Grose C, Webster-Cyriaque J. Wild-type Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus isolated from the oropharynx of immune-competent individuals has tropism for cultured oral epithelial cells. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):4074-84.
140. Della Bella S, Taddeo A, Calabro ML, Brambilla L, Bellinvia M, Bergamo E, et al. Peripheral Blood Endothelial Progenitors as Potential Reservoirs of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *PLoS ONE*. 2008;3(1):e1520.
141. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, et al. T cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. *J Infect Dis*. 2009 Nov 15;200(10):1611-5.
142. Inoue M, Yasui M, Sawada A, Koyama M, Sakata A, Takeshita Y, et al. [The role of cord blood stem cell transplantation in children; a retrospective analysis of 39 cases in a single institute]. *Rinsho Ketsueki*. 2006 Nov;47(11):1446-52.
143. Ishimura M, Ohga S, Nomura A, Toubou T, Morihana E, Saito Y, et al. Successful umbilical cord blood transplantation for severe chronic active Epstein-Barr virus infection after the double failure of hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2005 Nov;80(3):207-12.
144. Faucher S, Dimock K, Wright KE. Characterization of the Cyno-EBV LMP1 homologue and comparison with LMP1s of EBV and other EBV-like viruses. *Virus Res*. 2002 Dec;90(1-2):63-75.
145. Carvalho KS, Silvestre Ede A, Maciel Sda S, Lira HI, Galvao RA, Soares MJ, et al. PCR detection of multiple human herpesvirus DNA in saliva from HIV-infected individuals in Teresina, State of Piaui, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Nov-Dec;43(6):620-3.
146. Tanaka T, Kogawa K, Sasa H, Nonoyama S, Furuya K, Sato K. Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus,



- human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. *Biomed Res.* 2009 Oct;30(5):279-85.
147. Norton RA, Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Hocknell P, Dewhurst S. Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 1999 Nov;37(11):3672-5.
148. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990 Apr;262(4):56-61, 4-5.
149. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
150. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology.* 1992;24:476-80.
151. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):254-98.
152. Abdulmir AS, Hafidh RR, Abu Bakar F, Abbas K. Novel Epstein-Barr virus immunoglobulin G-based approach for the specific detection of nasopharyngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2010 Nov-Dec;31(6):410-7.
153. Costa E, Tormo N, Clari MA, Bravo D, Munoz-Cobo B, Navarro D. Performance of the Epstein-Barr virus and herpes simplex virus immunoglobulin m assays on the liaison platform with sera from patients displaying acute parvovirus B19 infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Aug;16(8):1247-8.
154. Adjei AA, Armah HB, Gbagbo F, Boamah I, Adu-Gyamfi C, Asare I. Seroprevalence of HHV-8, CMV, and EBV among the general population in Ghana, West Africa. *BMC Infect Dis.* 2008;8:111.
155. Straus S. Introduction to Herpesviridae. In: Mandell G, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2000. p. 1015-27.
156. Batalla AS, Benito D, Baumard S, Brodard V, Servettaz A, Jaussaud R, et al. [Epstein-Barr virus and cytomegalovirus primary infections: A comparative study in 52 immunocompetent adults.]. *Med Mal Infect.* 2011 Jan;41(1):14-9.
157. Hardie DR. Human gamma-herpesviruses: a review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus Apher Sci.* 2010 Apr;42(2):177-83.
158. Tan HH, Goh CL. Viral infections affecting the skin in organ transplant recipients: epidemiology and current management strategies. *Am J Clin Dermatol.* 2006;7(1):13-29.
159. Kumar D. Emerging viruses in transplantation. *Curr Opin Infect Dis.* 2010 Aug;23(4):374-8.
160. Kovaleva NE, Bakhlykova N, Bazarnyi VV. [Assessment of antiviral immunity in pregnant women with mixed infection (HIV + CMV), living in Surgut]. *Klin Lab Diagn.* 2009 Jul(7):35-7.
161. Colugnati FA, Staras SA, Dollard SC, Cannon MJ. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. *BMC Infect Dis.* 2007;7:71.
162. Boudewyns A, Declau F, Smets K, Ursi D, Eyskens F, Van den Ende J, et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: role in the diagnostic work-up of childhood hearing loss. *Otol Neurotol.* 2009 Oct;30(7):943-9.
163. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn.* 2008 Jul;10(4):279-92.
164. Klutts JS, Ford BA, Perez NR, Gronowski AM. Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. *J Clin Microbiol.* 2009 Oct;47(10):3204-10.
165. Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira 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.* 1996 Jul 25;335(4):233-41.
166. Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, 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 Oct 26;348(9035):1133-8.
167. Mbisa GL, Miley W, Gamache CJ, Gillette WK, Esposito D, Hopkins R, et al. Detection of antibodies to Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: A new approach using K8.1 ELISA and a newly developed recombinant LANA ELISA. *J Immunol Methods.* 2010 Mar 4.



168. Lang D, Hinderer W, Rothe M, Sonneborn HH, Neipel F, Raab M, et al. Comparison of the immunoglobulin-G-specific seroreactivity of different recombinant antigens of the human herpesvirus 8. *Virology*. 1999 Jul 20;260(1):47-54.
169. Zhu FX, Cusano T, Yuan Y. Identification of the immediate-early transcripts of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*. 1999 Jul;73(7):5556-67.
170. Broccolo F, Locatelli G, Sarmati L, Piergiovanni S, Veglia F, Andreoni M, et al. Calibrated real-time PCR assay for quantitation of human herpesvirus 8 DNA in biological fluids. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4652-8.
171. Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, Forghani B, Honarmand S, Khetsuriani N, et al. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar 15;36(6):731-42.
172. Tenorio A, Echevarria JE, Casas I, Echevarria JM, Tabares E. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1993 Oct;44(2-3):261-9.
173. Calonje E, Wilson Jones E. Tumors and Tumor-like conditions of blood vessels and lymphatics. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Jhonson BJ, editors. *Lever's Histopathology of the skin*. 8va ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 623-51.
174. Oropesa L, Sánchez L, Berdasquera D, Gala A, Pérez J, Lantero MI. Debut clínico de SIDA en Cuba. *Rev Cub Med Trop*. 2007;59(2):42-52.
175. Volkenandt M, Dicker A, Fanin R, Banerjee D, Albino S, Bertino JR. Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Paraffin-Embedded Tissue. In: Inc. HP, editor. *Methods in Molecular Biology PCR protocols: Current Methods and Applications*. EUA; 1993. p. 81-7.
176. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5189-98.
177. RoseMeyer RB, Mellick AS, Gamham BG, Harrison GJ, Massa HM, Griffiths LR. The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003 Mar;11(1):9-18.
178. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*. 2001 Jun;79(3):213-21.
179. Yun JJ, Heisler LE, Hwang, II, Wilkins O, Lau SK, Hycza M, et al. Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(12):e85.
180. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajdab M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol*. 2009;44:302-7.
181. Cruse JM, Lewis RE. *Illustrated dictionary of Immunology*. Third edition ed. New York: CRC Press; 2009.
182. Zong JC, Ciufu 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 May;73(5):4156-70.
183. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24:1596-9.
184. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14:817-8.
185. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope- An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*. 2007;460(8).
186. Kouri V, Resik S, Tenorio A, Suarez C, Garcia S. [Meningoencephalitis caused by Herpesviridae family virus in Cuba. 1996-1998]. *Rev Argent Microbiol*. 2000 Apr-Jun;32(2):77-82.



187. Skiest DJ. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis.* 2002 Jan 1;34(1):103-15.
188. Masliah E, DeTeresa RM, Mallory ME, Hansen LA. Changes in pathological findings at autopsy in AIDS cases for the last 15 years. *Aids.* 2000 Jan 7;14(1):69-74.
189. Bolokadze N, Gabunia P, Ezugbaia M, Gatsserelia L, Khechiashvili G. Neurological complications in patients with HIV/AIDS. *Georgian Med News.* 2008 Dec(165):34-8.
190. Skoldenberg B. Herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1996;100:8-13.
191. McGrath N, Anderson NE, Croxson MC, Powell KF. Herpes simplex encephalitis treated with acyclovir: diagnosis and long term outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997 Sep;63(3):321-6.
192. Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct;17(4):903-25, table of contents.
193. de Arazoza H, Lounes R, Perez J, Hoang T. What percentage of the Cuban HIV/AIDS epidemic is known? *Rev Cubana Med Trop.* 2003 Jan-Apr;55(1):30-7.
194. de Arazoza H, Joanes J, Lounes R, Legeai C, Clemenccon S, Perez J, et al. The HIV/AIDS epidemic in Cuba: description and tentative explanation of its low HIV prevalence. *BMC Infect Dis.* 2007;7:130.
195. Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, Janssen RS, Taylor AW, Lyss SB, et al. Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. *MMWR Recomm Rep.* 2006 Sep 22;55(RR-14):1-17; quiz CE1-4.
196. Schoefer H, Sachs DL. Kaposi's Sarcoma. In: Hoffmann C, Rockstroh J, Sebastian BK, editors. *HIV medicine 2006.* Paris: Flying Publisher; 2006. p. 481-90.
197. Quereda C, Corral I, Laguna F, Valencia ME, Tenorio A, Echeverria JE, et al. Diagnostic utility of a multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol.* 2000 Aug;38(8):3061-7.
198. Broccolo F, Iuliano R, Careddu AM, Trovato R, Lico S, Blanc PL, et al. Detection of lymphotropic herpesvirus DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neurological disease. *Acta Virol.* 2000 Jun-Aug;44(3):137-43.
199. Minjolle S, Arvieux C, Gautier AL, Jusselin I, Thomas R, Michelet C, et al. Detection of herpesvirus genomes by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. *J Clin Virol.* 2002 Jul;25 Suppl 1:S59-70.
200. Brodt HR, Kamps BS, Gute P, Knupp B, Staszewski S, Helm EB. Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *Aids.* 1997 Nov 15;11(14):1731-8.
201. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998 Mar 26;338(13):853-60.
202. Neuenburg JK, Brodt HR, Hemdier BG, Bickel M, Bacchetti P, Price RW, et al. HIV-related neuropathology, 1985 to 1999: rising prevalence of HIV encephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Oct 1;31(2):171-7.
203. Maschke M, Kastrup O, Esser S, Ross B, Hengge U, Hufnagel A. Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000 Sep;69(3):376-80.
204. Gema G, Piccinini G, Genini E, Percivalle E, Zavattoni M, Lilleri D, et al. Declining levels of rescued lymphoproliferative response to human cytomegalovirus (HCMV) in AIDS patients with or without HCMV disease following long-term HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Dec 1;28(4):320-31.
205. Keane NM, Price P, Lee S, Almeida CA, Stone SF, James I, et al. Restoration of CD4 T-cell responses to cytomegalovirus is short-lived in severely immunodeficient HIV-infected patients responding to highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2004 Nov;5(6):407-14.
206. Anderson AM, Fountain JA, Green SB, Bloom SA, Palmore MP. Human immunodeficiency virus-associated cytomegalovirus infection with multiple small vessel cerebral infarcts in the setting of early immune reconstitution. *J Neurovirol.* 2010 Apr;16(2):179-84.



207. Johnson T, Nath A. Neurological complications of immune reconstitution in HIV-infected populations. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Jan;1184:106-20.
208. French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *Aids*. 2004 Aug 20;18(12):1615-27.
209. Tselis A, Lavi E. Cytomegalovirus infection of the adult nervous system. In: Davis LE, Kennedy PG, editors. *Infectious diseases of the nervous system*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2000. p. 109-38.
210. Tang JW, Coward LJ, Davies NW, Geretti AM, Howard RS, Hirsch NP, et al. Brain stem encephalitis caused by primary herpes simplex 2 infection in a young woman. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Sep;74(9):1323-5.
211. Corti M, Villafane F, Trione N, Schtirbu R, Yampolsky C, Narbaitz M. [Primary central nervous system lymphomas in AIDS patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 Jun-Jul;22(6):332-6.
212. Toledo PV, Pellegrino LN, Cunha CA. Varicella-zoster virus encephalitis in an AIDS patient. *Braz J Infect Dis*. 2004 Jun;8(3):255-8.
213. Brown M, Scarborough M, Brink N, Manji H, Miller R. Varicella zoster virus-associated neurological disease in HIV-infected patients. *Int J STD AIDS*. 2001 Feb;12(2):79-83.
214. Bednarska A, Podlasin R, Karczewski G, Loch T, Horban A, Radkowski M. [Utility of multiplex PCR for diagnosis of neurological disorders in HIV-infected patients and patients with AIDS]. *Przegl Epidemiol*. 2005;59(4):873-9.
215. Vago L, Nebuloni M, Sala E, Cinque P, Bonetto S, Isella A, et al. Coinfection of the central nervous system by cytomegalovirus and herpes simplex virus type 1 or 2 in AIDS patients: autopsy study on 82 cases by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1996 Oct;92(4):404-8.
216. Weinberg A, Bloch KC, Li S, Tang YW, Palmer M, Tyler KL. Dual infections of the central nervous system with Epstein-Barr virus. *J Infect Dis*. 2005 Jan 15;191(2):234-7.
217. Zelman IB, Mossakowski MJ. Opportunistic infections of the central nervous system in the course of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Morphological analysis of 172 cases. *Folia Neuropathol*. 1998;36(3):129-44.
218. Eza D, Cerrillo G, Moore DA, Castro C, Ticona E, Morales D, et al. Postmortem findings and opportunistic infections in HIV-positive patients from a public hospital in Peru. *Pathol Res Pract*. 2006;202(11):767-75.
219. Chaudhuri A, Kennedy PG. Diagnosis and treatment of viral encephalitis. *Postgrad Med J*. 2002 Oct;78(924):575-83.
220. Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*. 2004 Jun;11 Suppl 2:48A-56A.
221. Griffiths P. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes*. 2004 Jun;11 Suppl 2:95A-104A.
222. Bernstein WB, Little RF, Wilson WH, Yarchoan R. Acquired immunodeficiency syndrome-related malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Int J Hematol*. 2006 Jul;84(1):3-11.
223. Yoshioka MC, Alchome MM, Porro AM, Tomimori-Yamashita J. Epidemiology of Kaposi's sarcoma in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Sao Paulo, Brazil. *Int J Dermatol*. 2004 Sep;43(9):643-7.
224. Ramos-da-Silva S, Elgui-de-Oliveira D, Borges L, Bacchi CE. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and Kaposi's sarcoma in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2006 May;39(5):573-80.
225. Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, et al. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1369-77.
226. Song J, Yoshida A, Yamamoto Y, Katano H, Hagihara K, Oka S, et al. Viral load of human herpesvirus 8 (HHV-8) in the circulatory blood cells correlates with clinical progression in a patient with HHV-8-associated solid lymphoma with aids-associated Kaposi's sarcoma. *Leuk Lymphoma*. 2004 Nov;45(11):2343-7.
227. Pellett PE, Spira TJ, Bagasra O, Boshoff C, Corey L, de Lellis L, et al. Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 8 DNA in semen. *J Clin Microbiol*. 1999 May;37(5):1298-301.



228. Speers DJ. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev.* 2006;27:39-51.
229. Donald CE, Qureshi F, Burns MJ, Holden MJ, Blasic JR, Jr., Woolford AJ. An inter-platform repeatability study investigating real-time amplification of plasmid DNA. *BMC Biotechnol.* 2005;5:15.
230. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods.* 2001 Dec;25(4):419-29.
231. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):165-256.
232. Pennings JL, Van De Locht LT, Jansen JH, Van der Reijden BA, De Witte T, Mensink EJ. Degradable dU-based DNA template as a standard in real-time PCR quantitation. *Leukemia.* 2001 Dec;15(12):1962-5.
233. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A-Z of quantitative PCR.* La Jolla, CA, USA: IUL; 2004. p. 1-20.
234. Stocher M, Berg J. Normalized quantification of human cytomegalovirus DNA by competitive real-time PCR on the LightCycler instrument. *J Clin Microbiol.* 2002 Dec;40(12):4547-53.
235. Swillens S, Goffard JC, Marechal Y, de Kerchove d'Exaerde A, El Housni H. Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(6):e56.
236. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics.* 2005;6:62.
237. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
238. Kuhne BS, Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques.* 2002 Nov;33(5):1078, 80-2, 84 passim.
239. Arezi B, Xing W, Sorge JA, Hogrefe HH. Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal Biochem.* 2003 Oct 15;321(2):226-35.
240. Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):897-901.
241. Gulley ML, Fan H, Elmore SH. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr virus quantification reagents in a clinical laboratory setting. *J Mol Diagn.* 2006 Nov;8(5):589-97.
242. Kabamba-Mukadi B, Henrivaux P, Ruelle J, Delferriere N, Bodeus M, Goubau P. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA load in purified CD4+ cells by LightCycler real-time PCR. *BMC Infect Dis.* 2005;5(1):15.
243. Cankar K, Stebih D, Dreo T, Zel J, Gruden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 2006;6:37.
244. Saikaly PE, Barlaz MA, de Los Reyes FL, 3rd. Development of quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of surrogate biological warfare agents in building debris and leachate. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Oct;73(20):6557-65.
245. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
246. Bernard PS, Wittwer CT. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry.* 2002;48(8):1178–85.
247. Ellison SL, English CA, Burns MJ, Keer JT. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2006;6:33.
248. Lai KK, Cook L, Krantz EM, Corey L, Jerome KR. Calibration curves for real-time PCR. *Clin Chem.* 2005 Jul;51(7):1132-6.
249. Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 15;31(14):e73.



250. Wiseman G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *J AOAC Int.* 2002 May-Jun;85(3):792-6.
251. Teo IA, Choi JW, Morlese J, Taylor G, Shaunak S. LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. *J Immunol Methods.* 2002 Dec 1;270(1):119-33.
252. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, J.J.M. vD. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003;17:1013-34.
253. Durtschi JD, Stevenson J, Hymas W, Voelkerding KV. Evaluation of quantification methods for real-time PCR minor groove binding hybridization probe assays. *Anal Biochem.* 2007 Feb 1;361(1):55-64.
254. Kennedy MM, Cooper K, Howells DD, Picton S, Biddolph S, Lucas SB, et al. Identification of HHV8 in early Kaposi's sarcoma: implications for Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Mol Pathol.* 1998 Feb;51(1):14-20.
255. Cannon MJ, Dollard SC, Black JB, Edlin BR, Hannah C, Hogan SE, et al. Risk factors for Kaposi's sarcoma in men seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *Aids.* 2003 Jan 24;17(2):215-22.
256. 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 Nov;68(3):399-403.
257. Boivin G, Gaudreau A, Routy JP. Evaluation of the human herpesvirus 8 DNA load in blood and Kaposi's sarcoma skin lesions from AIDS patients on highly active antiretroviral therapy. *Aids.* 2000 Sep 8;14(13):1907-10.
258. Martro E, Cannon MJ, Dollard SC, Spira TJ, Laney AS, Ou CY, et al. Evidence for both lytic replication and tightly regulated human herpesvirus 8 latency in circulating mononuclear cells, with virus loads frequently below common thresholds of detection. *J Virol.* 2004 Nov;78(21):11707-14.
259. Duprez R, Kassa-Kelembho E, Plancoulaine S, Briere J, Fossi M, Kobangue L, et al. Human herpesvirus 8 serological markers and viral load in patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in Central African Republic. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4840-3.
260. Ambroziak JA, Blackburn DJ, Herndier BG, Glogau RG, Gullett JH, McDonald AR, et al. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science.* 1995 Apr 28;268(5210):582-3.
261. Porter SR, Di Alberti L, Kumar N. Human herpes virus 8 (Kaposi's sarcoma herpesvirus). *Oral Oncol.* 1998 Jan;34(1):5-14.
262. Boldogh I, Szaniszlo P, Bresnahan WA, Flaitz CM, Nichols MC, Albrecht T. Kaposi's sarcoma herpesvirus-like DNA sequences in the saliva of individuals infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1996 Aug;23(2):406-7.
263. Triantos D, Horefti E, Paximadi E, Kyriakopoulou Z, Karakassiliotis G, Papanastasiou K, et al. Presence of human herpes virus-8 in saliva and non-lesional oral mucosa in HIV-infected and oncologic immunocompromised patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Jun;19(3):201-4.
264. Brown EE, Fallin MD, Goedert JJ, Hutchinson A, Vitale F, Lauria C, et al. Host immunogenetics and control of human herpesvirus-8 infection. *J Infect Dis.* 2006 Apr 15;193(8):1054-62.
265. Pak F, Pyakural P, Kokhaei P, Kaaya E, Pourfathollah AA, Selivanova G, et al. HHV-8/KSHV during the development of Kaposi's sarcoma: evaluation by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Cutan Pathol.* 2005 Jan;32(1):21-7.
266. Massambu C, Pyakurel P, Kaaya E, Enborn M, Urassa W, Demirhan I, et al. Serum HHV8 DNA and Tat antibodies in Kaposi's sarcoma patients with and without HIV-1 infection. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3B):2389-95.
267. Marcelin AG, Gorin I, Morand P, Ait-Arkoub Z, Deleuze J, Morini JP, et al. Quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in blood, oral mucosa, and saliva in patients with Kaposi's sarcoma. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004 Jul;20(7):704-8.
268. Gaidano G, Pastore C, Gloghini A, Cusini M, Nomdedeu J, Volpe G, et al. Distribution of human herpesvirus-8 sequences throughout the spectrum of AIDS-related neoplasia. *Aids.* 1996 Aug;10(9):941-9.



269. Lebbe C, Agbalika F, de Cremoux P, Deplanche M, Rybojad M, Masgrau E, et al. Detection of human herpesvirus 8 and human T-cell lymphotropic virus type 1 sequences in Kaposi sarcoma. *Arch Dermatol.* 1997 Jan;133(1):25-30.
270. Dupin N, Gorin I, Deleuze J, Agut H, Huraux JM, Escande JP. Herpes-like DNA sequences, AIDS-related tumors, and Castleman's disease. *N Engl J Med.* 1995 Sep 21;333(12):798; author reply -9.
271. Boshoff C, Talbot S, Kennedy M, O'Leary J, Schulz T, Chang Y. HHV8 and skin cancers in immunosuppressed patients. *Lancet.* 1996 Jul 13;348(9020):138.
272. Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H. Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in KSHV-associated diseases. *J Infect Dis.* 2006 Mar 15;193(6):773-82.
273. Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Biberfeld P. KSHV/HHV-8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development. *Infect Agent Cancer.* 2007;2:4.
274. Feller L, Lemmer J. Insights into pathogenic events of HIV-associated Kaposi sarcoma and immune reconstitution inflammatory syndrome-related Kaposi sarcoma. *Infect Agent Cancer.* 2008 Jan 21;3(1):1.
275. Mercader M, Nickoloff BJ, Foreman KE. Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jun;125(6):785-9.
276. Yen-Moore A, Hudnall SD, Rady PL, Wagner RF, Jr., Moore TO, Memar O, et al. Differential expression of the HHV-8 vGCR cellular homolog gene in AIDS-associated and classic Kaposi's sarcoma: potential role of HIV-1 Tat. *Virology.* 2000 Feb 15;267(2):247-51.
277. Zeng Y, Zhang X, Huang Z, Cheng L, Yao S, Qin D, et al. Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2401-17.
278. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Jun;67(2):175-212, table of contents.
279. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Sturzl M, Monini P. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer.* 2001 Jul;37(10):1251-69.
280. Pak F, Mwakigonja AR, Kokhaei P, Hosseinzadeh N, Pyakurel P, Kaaya E, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus load in biopsies of cutaneous and oral Kaposi's sarcoma lesions. *Eur J Cancer.* 2007 Aug;43(12):1877-82.
281. Krajick K. Glacial research. Melting glaciers release ancient relics. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):454-6.
282. Rollo F, Ermini L, Luciani S, Marota I, Olivieri C, Luiselli D. Fine characterization of the Iceman's mtDNA haplogroup. *Am J Phys Anthropol.* 2006 Aug;130(4):557-64.
283. Koppelstaetter C, Jennings P, Hochegger K, Perco P, Ischia R, Karkoszka H, et al. Effect of tissue fixatives on telomere length determination by quantitative PCR. *Mech Ageing Dev.* 2005 Dec;126(12):1331-3.
284. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J. Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006 Mar;54(3):371-4.
285. Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, et al. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol.* 2007 Jul;17(3):297-303.
286. Hammock L, Reisenauer A, Wang W, Cohen C, Birdsong G, Folpe AL. Latency-associated nuclear antigen expression and human herpesvirus-8 polymerase chain reaction in the evaluation of Kaposi sarcoma and other vascular tumors in HIV-positive patients. *Mod Pathol.* 2005 Apr;18(4):463-8.
287. Bezold G, Messer G, Peter R, Flaig M, Sander C. Quantitation of human herpes virus 8 DNA in paraffin-embedded biopsies of HIV-associated and classical Kaposi's sarcoma by PCR. *J Cutan Pathol.* 2001 Mar;28(3):127-30.
288. Brown EE, Whitby D, Vitale F, Fei PC, Del Carpio C, Marshall V, et al. Correlates of Human Herpesvirus-8 DNA detection among adults in Italy without Kaposi sarcoma. *Int J Epidemiol.* 2005 Oct;34(5):1110-7.



289. Grundhoff A, Ganem D. Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis. *J Clin Invest*. 2004 Jan;113(1):124-36.
290. Schulz TF. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol*. 2006 Jan;208(2):187-98.
291. Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol*. 1997 Jan;71(1):715-9.
292. Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, et al. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med*. 1996 Mar;2(3):342-6.
293. Dorjsuren D, Burnette A, Gray GN, Chen X, Zhu W, Roberts PE, et al. Chemical library screen for novel inhibitors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus processive DNA synthesis. *Antiviral Res*. 2006 Jan;69(1):9-23.
294. Brown EE, Whitby D, Vitale F, Marshall V, Mbisa G, Gamache C, et al. Virologic, hematologic, and immunologic risk factors for classic Kaposi sarcoma. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2282-90.
295. Judde JG, Lacoste V, Briere J, Kassa-Kelembho E, Clyti E, Couppie P, et al. Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May 3;92(9):729-36.
296. Dittmer DP. Transcription profile of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in primary Kaposi's sarcoma lesions as determined by real-time PCR arrays. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2010-5.
297. Diamond C, Brodie SJ, Krieger JN, Huang ML, Koelle DM, Diem K, et al. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J Virol*. 1998 Jul;72(7):6223-7.
298. 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*. 1995 Dec;1(12):1274-8.
299. Dittmer D, Lagunoff M, Renne R, Staskus K, Haase A, Ganem D. A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*. 1998 Oct;72(10):8309-15.
300. Yin CC, Jones D. Molecular approaches towards characterization, monitoring and targeting of viral-associated hematological malignancies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006 Nov;6(6):831-41.
301. Maeda N, Yamashita Y, Kimura H, Hara S, Mori N. Quantitative analysis of herpesvirus load in the lymph nodes of patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis using a real-time PCR assay. *Diagn Mol Pathol*. 2006 Mar;15(1):49-55.
302. Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood outgrowth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood*. 2002 Jan 15;99(2):457-62.
303. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2752-60.
304. Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, et al. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1527-37.
305. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1801-9.
306. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res*. 2003 Nov 28;93(11):1023-5.
307. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, et al. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jul;27(7):1572-9.
308. Schattman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H1-18.
309. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1525-31.
310. de Souza VA, Sumita LM, Nascimento MC, Oliveira J, Mascheretti M, Quiroga M, et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in amerindian and non-amerindian populations in the brazilian Amazon region. *J Infect Dis*. 2007 Sep 15;196(6):844-52.



311. Al-Otaibi LM, Ngui SL, Scully CM, Porter SR, Teo CG. Salivary human herpesvirus 8 shedding in renal allograft recipients with Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2007 Jul 2;79(9):1357-65.
312. Stamey FR, Patel MM, Holloway BP, Pellett PE. Quantitative, fluorogenic probe PCR assay for detection of human herpesvirus 8 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2001 Oct;39(10):3537-40.
313. Kouri V, Eng SM, Rodriguez ME, Resik S, Orraca O, Moore PS, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in various populations in Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* 2004 May;15(5):320-5.
314. Grange PA, Marcelin AG, Calvez V, Chauvel C, Escande JP, Dupin N. Salivary lactoferrin is recognized by the human herpesvirus-8. *J Invest Dermatol.* 2005 Jun;124(6):1249-58.
315. Gasperini P, Barbierato M, Martinelli C, Rigotti P, Marchini F, Masserizzi G, et al. Use of a BJAB-derived cell line for isolation of human herpesvirus 8. *J Clin Microbiol.* 2005 Jun;43(6):2866-75.
316. Smith MS, Bloomer C, Horvat R, Goldstein E, Casparian JM, Chandran B. Detection of human herpesvirus 8 DNA in Kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements. *J Infect Dis.* 1997 Jul;176(1):84-93.
317. Decker LL, Shankar P, Khan G, Freeman RB, Dezube BJ, Lieberman J, et al. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J Exp Med.* 1996 Jul 1;184(1):283-8.
318. Polstra AM, Cornelissen M, Goudsmit J, van der Kuyl AC. Retrospective, longitudinal analysis of serum human herpesvirus-8 viral DNA load in AIDS-related Kaposi's sarcoma patients before and after diagnosis. *J Med Virol.* 2004 Nov;74(3):390-6.
319. Harrington WJ, Jr., Bagasra O, Sosa CE, Bobroski LE, Baum M, Wen XL, et al. Human herpesvirus type 8 DNA sequences in cell-free plasma and mononuclear cells of Kaposi's sarcoma patients. *J Infect Dis.* 1996 Nov;174(5):1101-5.
320. Kuo CP, Wu CL, Ho HT, Chen CG, Liu SI, Lu YT. Detection of cytomegalovirus reactivation in cancer patients receiving chemotherapy. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Mar;14(3):221-7.
321. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2008 Feb;46(2):493-8.
322. Panagiotakis SH, Soufla G, Baritaki S, Sourvinos G, Passam A, Zagoreos I, et al. Concurrent CMV and EBV DNAemia is significantly correlated with a delay in the response to HAART in treatment-naive HIV type 1-positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Jan;23(1):10-8.
323. Casper C, Krantz E, Selke S, Kuntz SR, Wang J, Huang ML, et al. Frequent and asymptomatic oropharyngeal shedding of human herpesvirus 8 among immunocompetent men. *J Infect Dis.* 2007 Jan 1;195(1):30-6.
324. Fernandez L, Serraino D, Rezza G, Lence J, Ortiz RM, Cruz T, et al. Infection with human herpesvirus type 8 and human T-cell leukaemia virus type 1 among individuals participating in a case-control study in Havana City, Cuba. *Br J Cancer.* 2002 Nov 18;87(11):1253-6.
325. Yee S, Varona J, Díaz C. Variantes clínicas del Sarcoma hemorrágico de Kaposi. *Rev Cub Med.* 1981;20(4):360-5.
326. Kouri V, Martinez PA, Acosta B, Rodriguez ME, Blanco O, Capo V, et al. First report of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences from Cuban Kaposi's sarcoma patients without HIV infection. *Aids.* 2007 Oct 1;21(15):2113-5.
327. Pérez A, Molina S, Mármol A, Pérez JC, Herrera M, Parodis Y. Sarcoma de Kaposi en el paciente receptor de un trasplante renal. Presentación de 1 caso. *Rev Cub Med.* 2004;43(1):1-5.
328. Cook RD, Hodgson TA, Waugh AC, Molyneux EM, Borgstein E, Sherry A, et al. Mixed patterns of transmission of human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Malawian families. *J Gen Virol.* 2002 Jul;83(Pt 7):1613-9.
329. Chironna M, Tosatti MA, Di Gangi IM, Sallustio A, Germinario C, Coluzzi M, et al. High human herpesvirus 8 seroprevalence in populations from Western Balkan countries. *J Med Virol.* 2006 Jul;78(7):933-7.



330. Plancoulaine S, Abel L, Tregouet D, Duprez R, van Beveren M, Tortevoeye P, et al. 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 Dec 1;64(23):8782-7.
331. Cunha AM, Caterino-de-Araujo A, Costa SC, Santos-Fortuna E, Boa-Sorte NC, Goncalves MS, et al. Increasing seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol.* 2005 Sep;86(Pt 9):2433-7.
332. Guttman-Yassky E, Kra-Oz Z, Dubnov J, Friedman-Birnbaum R, Segal I, Zaltzman N, et al. Infection with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus among families of patients with classic Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol.* 2005 Nov;141(11):1429-34.
333. Guttman-Yassky E, Cohen A, Kra-Oz Z, Friedman-Birnbaum R, Sprecher E, Zaltzman N, et al. Familial clustering of classic Kaposi sarcoma. *J Infect Dis.* 2004 Jun 1;189(11):2023-6.
334. Casper C, Carrell D, Miller KG, Judson FD, Meier AS, Pauk JS, et al. HIV serodiscordant sex partners and the prevalence of human herpesvirus 8 infection among HIV negative men who have sex with men: baseline data from the EXPLORE Study. *Sex Transm Infect.* 2006 Jun;82(3):229-35.
335. Giuliani M, Cordiali Fei P, Castilletti C, Di Carlo A, Palamara G, Boros S, et al. Incidence of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Infection among HIV-uninfected individuals at high risk for sexually transmitted infections. *BMC Infect Dis.* 2007 Dec 5;7(1):143.
336. Safai B, Johnson KG, Myskowski PL, Koziner B, Yang SY, Cunningham-Rundles S, et al. The natural history of Kaposi's sarcoma in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1985 Nov;103(5):744-50.
337. Hu DJ, Fleming PL, Castro KG, Jones JL, Bush TJ, Hanson D, et al. How important is race/ethnicity as an indicator of risk for specific AIDS-defining conditions? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995 Nov 1;10(3):374-80.
338. Nawar E, Mbulaiteye SM, Gallant JE, Wohl DA, Ardini M, Hendershot T, et al. Risk factors for Kaposi's sarcoma among HHV-8 seropositive homosexual men with AIDS. *Int J Cancer.* 2005 Jun 10;115(2):296-300.
339. Davidovici B, Karakis I, Bourboulia D, Ariad S, Zong J, Benharroch D, et al. Seroepidemiology and molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus among Jewish population groups in Israel. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 7;93(3):194-202.
340. Dedicoat M, Newton R. Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. *Br J Cancer.* 2003 Jan 13;88(1):1-3.
341. Dukers NH, Rezza G. Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know. *Aids.* 2003 Aug 15;17(12):1717-30.
342. Mbulaiteye SM, Engels EA. Kaposi's sarcoma risk among transplant recipients in the United States (1993-2003). *Int J Cancer.* 2006 Dec 1;119(11):2685-91.
343. Lehmbecher TL, Foster CB, Zhu S, Venzon D, Steinberg SM, Wyvill K, et al. Variant genotypes of FcgammaRIIIA influence the development of Kaposi's sarcoma in HIV-infected men. *Blood.* 2000 Apr 1;95(7):2386-90.
344. Foster CB, Lehmbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, et al. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood.* 2000 Oct 1;96(7):2562-7.
345. Martro E, Esteve A, Schulz TF, Sheldon J, Gambus G, Munoz R, et al. Risk factors for human Herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma among men who have sex with men in a European multicentre study. *Int J Cancer.* 2007 Mar 1;120(5):1129-35.
346. Szajerka T, Jablecki J. Kaposi's sarcoma revisited. *AIDS Rev.* 2007 Oct-Dec;9(4):230-6.
347. Widmer IC, Erb P, Grob H, Itin P, Baumann M, Stalder A, et al. Human herpesvirus 8 oral shedding in HIV-infected men with and without Kaposi sarcoma. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006 Aug 1;42(4):420-5.
348. Grulich AE, Cunningham P, Munier ML, Prestage G, Amin J, Ringland C, et al. Sexual behaviour and human herpesvirus 8 infection in homosexual men in Australia. *Sex Health.* 2005;2(1):13-8.
349. Frisch M, Smith E, Grulich A, Johansen C. Cancer in a population-based cohort of men and women in registered homosexual partnerships. *Am J Epidemiol.* 2003 Jun 1;157(11):966-72.



350. Casper C, Wald A, Pauk J, Tabet SR, Corey L, Celum CL. Correlates of prevalent and incident Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in men who have sex with men. *J Infect Dis.* 2002 Apr 1;185(7):990-3.
351. Guttman-Yassky E, Abada R, Kra-Oz Z, Sattinger J, Perelman A, Bergman R, et al. Relationship between human herpesvirus 8 loads and disease stage in classic Kaposi sarcoma patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Apr;57(4):387-92.
352. Edelman DC, Sill A. A lack of clinical correlation between the presence of HHV-8 DNA in PBMCs and staging of Kaposi's sarcoma. *Dermatology.* 2002;205(2):189.
353. Quinlivan EB, Zhang C, Stewart PW, Komoltri C, Davis MG, Wehbie RS. Elevated virus loads of Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus 8 predict Kaposi's sarcoma disease progression, but elevated levels of human immunodeficiency virus type 1 do not. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1736-44.
354. Laney AS, Cannon MJ, Jaffe HW, Offermann MK, Ou CY, Radford KW, et al. Human herpesvirus 8 presence and viral load are associated with the progression of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Aids.* 2007 Jul 31;21(12):1541-5.
355. Engels EA, Biggar RJ, Marshall VA, Walters MA, Gamache CJ, Whitby D, et al. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Aids.* 2003 Aug 15;17(12):1847-51.
356. Pellet C, Chevret S, Blum L, Gauville C, Hurault M, Blanchard G, et al. Virologic and immunologic parameters that predict clinical response of AIDS-associated Kaposi's sarcoma to highly active antiretroviral therapy. *J Invest Dermatol.* 2001 Oct;117(4):858-63.
357. 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 Aug 1;190(3):484-8.
358. Laney AS, Dollard SC, Jaffe HW, Offermann MK, Spira TJ, Gunthel CJ, et al. Repeated measures study of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA and antibodies in men seropositive for both HHV-8 and HIV. *Aids.* 2004 Sep 3;18(13):1819-26.
359. Aboulafla DM. The epidemiologic, pathologic, and clinical features of AIDS-associated pulmonary Kaposi's sarcoma. *Chest.* 2000 Apr;117(4):1128-45.
360. Gallafent JH, Buskin SE, De Turk PB, Aboulafla DM. Profile of patients with Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 20;23(6):1253-60.
361. Nasti G, Talamini R, Antinori A, Martellotta F, Jacchetti G, Chiodo F, et al. AIDS-related Kaposi's Sarcoma: evaluation of potential new prognostic factors and assessment of the AIDS Clinical Trial Group Staging System in the Haart Era—the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors and the Italian Cohort of Patients Naive From Antiretrovirals. *J Clin Oncol.* 2003 Aug 1;21(15):2876-82.
362. Leidner RS, Aboulafla DM. Recrudescence Kaposi's sarcoma after initiation of HAART: a manifestation of immune reconstitution syndrome. *AIDS Patient Care STDS.* 2005 Oct;19(10):635-44.
363. Bower M, Nelson M, Young AM, Thirtwell C, Newsom-Davis T, Mandalia S, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5224-8.
364. Nsubuga MM, Biggar RJ, Combs S, Marshall V, Mbisa G, Kambugu F, et al. Human herpesvirus 8 load and progression of AIDS-related Kaposi sarcoma lesions. *Cancer Lett.* 2008 Jan 28.
365. Chau I, Kelleher MT, Cunningham D, Norman AR, Wotherspoon A, Trott P, et al. Rapid access multidisciplinary lymph node diagnostic clinic: analysis of 550 patients. *Br J Cancer.* 2003 Feb 10;88(3):354-61.
366. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
367. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007 Mar;18(3):581-92.
368. Pantanowitz L, Pihan G, Carbone A, Dezube BJ. Differentiating HIV-associated non-Hodgkin's lymphomas with similar plasmacellular differentiation. *J HIV Ther.* 2009 Jun;14(2):24-33.



369. Ramos da Silva S, Elgui de Oliveira D. HIV, EBV and KSHV: Viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. *Cancer Lett.* 2011 Mar 12.
370. Carbone A, Gloghini A, Serraino D, Spina M. HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Curr Opin HIV AIDS.* 2009 Jan;4(1):3-10.
371. Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK. Immunodeficiency-associated lymphomas. *Blood Rev.* 2008 Sep;22(5):261-81.
372. Jabri L. [Lymphomas and HIV: updates]. *Ann Pathol.* 2008 Nov;28 Spec No 1(1):S114-7.
373. Johnston PB, Yuan R, Cavalli F, Witzig TE. Targeted therapy in lymphoma. *J of Hemat & Oncol.* 2010;3(45).
374. Jaffe E. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology.* 2009:523-31.
375. Miralles F, Ortega LM, Oropesa L, Rodríguez F, Capó V. Comportamiento de linfoma relacionado con VIH/SIDA en el Instituto "Pedro Kouri". 2004-2005. *Rev Cub Med Trop.* 2006;58(3):248-53.
376. Xie ZD, Wang L, Lu D, Zhou CJ, Shen KL. [Correlation of Epstein-Barr virus infection and childhood lymphoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2008 May;30(5):365-7.
377. Huang YH, Wu QL, Zong YS, Feng YF, Liang JZ, Hou JH, et al. Clinicopathologic features and Epstein-Barr virus infection status of Burkitt's lymphoma in Guangzhou district. *Ai Zheng.* 2009 Aug;28(8):805-12.
378. Kalungi S, Wabinga H, Bostad L. Reactive lymphadenopathy in Ugandan patients and its relationship to EBV and HIV infection. *APMIS.* 2009 Apr;117(4):302-7.
379. Delecluse HJ, Feederle R, O'Sullivan B, Taniere P. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol.* 2007 Dec;60(12):1358-64.
380. Yang WP, Zhu CD, Gong LP, Lu BB, Zou Y, Zhong HS, et al. [Clinicopathologic and immunohistochemical study of intra-abdominal non-Hodgkin B-cell lymphoma occurring in children.]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2009 Nov;38(11):759-64.
381. Gao SJ, 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. *Nat Med.* 1996 Aug;2(8):925-8.
382. Chen N, Nelson KE, Jenkins FJ, Suriyanon V, Duerr A, Costello C, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in Northern Thailand. *Clin Infect Dis.* 2004 Oct 1;39(7):1052-8.
383. Foti G, Hyeraci M, Kunkar A, Ieropoli G, Sofo D, De Lorenzo S, et al. [Cytomegalovirus infection in the adult]. *Minerva Med.* 2002 Apr;93(2):109-17.
384. Kalugina M, Orlova OA, Rybalkina TN, Karazhas NV. [The rate of human herpes virus type 6 and cytomegalovirus among HIV-infected and healthy women from Chelyabinsk and Moscow]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2007 May-Jun(3):81-3.
385. Chakraborty N, Bhattacharyya S, De C, Mukherjee A, Bhattacharya D, Santra S, et al. Incidence of multiple Herpesvirus infection in HIV seropositive patients, a big concern for Eastern Indian scenario. *Virology.* 2011;7:147.
386. He N, Chen L, Lin HJ, Zhang M, Wei J, Yang JH, et al. Multiple viral coinfections among HIV/AIDS patients in China. *Biosci Trends.* 2010 Feb;5(1):1-9.
387. Luchsinger V, Luzoro A, Martinez MJ. [High seroprevalence of cytomegalovirus, herpes simplex type 1 virus and Epstein Barr virus infection among human immunodeficiency virus-infected adults]. *Rev Med Chil.* 2010 Jul;138(7):809-14.
388. Jacobson MA, Ditmer DP, Sinclair E, Martin JN, Deeks SG, Hunt P, et al. Human herpesvirus replication and abnormal CD8+ T cell activation and low CD4+ T cell counts in antiretroviral-suppressed HIV-infected patients. *PLoS One.* 2009;4(4):e5277.
389. Kouri V, Martinez PA, Blanco O, Capo V, Rodriguez ME, Dovigny Mdel C, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus load in asymptomatic contacts of Cuban epidemic KS patients. *Arch Virol.* 2010 Dec;155(12):1971-6.
390. de Franca TR, de Araujo RA, Ribeiro CM, Leao JC. Salivary shedding of HHV-8 in people infected or not by human immunodeficiency virus 1. *J Oral Pathol Med.* 2010 Jan;40(1):97-102.



391. Grande SR, Imbronito AV, Okuda OS, Pannuti CM, Nunes FD, Lima LA. Relationship between herpes viruses and periodontopathogens in HIV patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2011 May 12.
392. Soto Y. Detección de virus de Epstein Barr en trastornos linfoproliferativos asociados al SIDA mediante reacción en cadena de la polimerasa [tesis]. Habana: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"; 1993.
393. Sachithanandham J, Ramamurthy M, Kannangai R, Daniel HD, Abraham OC, Rupali P, et al. Detection of opportunistic DNA viral infections by multiplex PCR among HIV infected individuals receiving care at a tertiary care hospital in South India. *Indian J Med Microbiol*. 2009 Jul-Sep;27(3):210-6.
394. Bahnassy AA, Zekri AR, Asaad N, El-Houssini S, Khalid HM, Sedky LM, et al. Epstein-Barr viral infection in extranodal lymphoma of the head and neck: correlation with prognosis and response to treatment. *Histopathology*. 2006 Apr;48(5):516-28.
395. Miyagi J, Toda T, Uezato H, Ohshima K, Miyakuni T, Takasu N, et al. Detection of Epstein-Barr virus and human T-cell lymphotropic virus type 1 in malignant nodal lymphoma, studied in Okinawa, a subtropical area in Japan. *Int J Hematol*. 2002 Jan;75(1):78-84.
396. Pajand O, Pourakbari B, Mahjob F, Aghamohammadi A, Mamishi N, Mamishi S. Detection of Epstein-Barr virus DNA in plasma and lymph node biopsy samples of pediatric and adult patients with Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010 Feb;28(1):10-5.
397. Duval A, Raphael M, Brennetot C, Poirel H, Buhard O, Aubry A, et al. The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):5002-7.
398. Carbone A. Emerging pathways in the development of AIDS-related lymphomas. *Lancet Oncol*. 2003 Jan;4(1):22-9.
399. Gujral S, Gandhi JS, Valsangkar S, Shet TM, Epari S, Subramanian PG. Study of the morphological patterns and association of Epstein-Barr virus and human herpes virus 8 in acquired immunodeficiency deficiency syndrome-related reactive lymphadenopathy. *Indian J Pathol Microbiol*. 2011 Oct-Dec;53(4):723-8.
400. Abdel-Aziz M, El-Hoshy H, Rashed M, Qotb M, Awad S, Naguib N. Epstein-Barr virus infection as a cause of cervical lymphadenopathy in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011 Apr;75(4):564-7.
401. Dargent JL, Haller A, Durdurez JP, Gennotte AF. Atypical hyperplasia of the marginal zone of B follicles in a polymorphic Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder occurring in an adolescent with human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Dev Pathol*. 2009 Jan-Feb;12(1):59-62.
402. Ban S, Goto Y, Kamada K, Takahama M, Watanabe H, Iwahori T, et al. Systemic granulomatous arteritis associated with Epstein-Barr virus infection. *Virchows Arch*. 1999 Mar;434(3):249-54.
403. Sabeti M, Slots J. Herpesviral-bacterial coinfection in periapical pathosis. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):69-72.
404. Tonoyama Y, Teramoto N, Sarker AB, Yoshino T, Hayashi K, Takahashi K, et al. Detection of Epstein-Barr virus RNA and related antigens in non-neoplastic lymphoid lesions. *Acta Med Okayama*. 1996 Apr;50(2):89-96.
405. Grande SR, Imbronito AV, Okuda OS, Lotufo RF, Magalhaes MH, Nunes FD. Herpes viruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and -negative patients. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):838-45.
406. Amornthatree K, Sriplung H, Mitamun W, Nittayananta W. Effects of long-term use of antiretroviral therapy on the prevalence of oral Epstein-Barr virus. *J Oral Pathol Med*. 2011 Oct 8.
407. Nikoobakht M, Beitollahi J, Nikoobakht N, Aloosh M, Sahebamee M, Rezaeidanesh M, et al. Evaluation of Epstein-Barr virus load in saliva before and after renal transplantation. *Transplant Proc*. 2011 Mar;43(2):540-2.
408. Isegawa Y, Katahira J, Yamanishi K, Sugimoto N. Reactivation of latent human immunodeficiency virus 1 by human herpesvirus 6 infection. *Acta Virol*. 2007;51(1):13-20.
409. Biancotto A, Grivel JC, Lisco A, Vanpouille C, Markham PD, Gallo RC, et al. Evolution of SIV toward RANTES resistance in macaques rapidly progressing to AIDS upon coinfection with HHV-6A. *Retrovirology*. 2009;6:61.
410. Lusso P, Crowley RW, Malnati MS, Di Serio C, Ponzoni M, Biancotto A, et al. Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5067-72.



411. Lucht E, Brytting M, Bjerregaard L, Julander I, Linde A. Shedding of cytomegalovirus and herpesviruses 6, 7, and 8 in saliva of human immunodeficiency virus type 1-infected patients and healthy controls. *Clin Infect Dis*. 1998 Jul;27(1):137-41.
412. Magalhaes IM, Martins RV, Cossatis JJ, Cavaliere RM, Afonso LA, Moyses N, et al. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Nov;105(7):925-7.
413. Tailor PB, Saikia TK, Advani SH, Mukhopadhyaya R. Activation of HHV-6 in lymphoproliferative disorders: a polymerase chain reaction-based study. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Jun;1022:282-5.
414. Schmidt CA, Oettle H, Peng R, Binder T, Wilborn F, Huhn D, et al. Presence of human beta- and gamma-herpes virus DNA in Hodgkin's disease. *Leuk Res*. 2000 Oct;24(10):865-70.
415. Kouri V, Martinez PA, Blanco O, Capo V, Rodriguez ME, Dovigny Mdel C, et al. Simultaneous quantification of human herpesvirus 8 DNA by real time PCR in different tissues of HIV infected cuban patients with Kaposi's sarcoma. *Herpesviridae*. 2010;1(3).
416. Loddenkemper C, Longerich T, Schneider T, Anagnostopoulos I, Foss HD, Schirmacher P, et al. [The morphologic variants of KSHV/HHV 8-associated lymphoproliferations.]. *Pathologe*. 2006 Dec 12.
417. Lazzi S, Bellan C, Amato T, Palumbo N, Cardone C, D'Amuri A, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 infection in reactive lymphoid tissues: a model for KSHV/HHV-8-related lymphomas? *Hum Pathol*. 2006 Jan;37(1):23-31.
418. Engels EA, Mbulaiteye SM, Othieno E, Gomez M, Mathew S, Cesarman E, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in non-Hodgkin lymphoma and reactive lymphadenopathy in Uganda. *Hum Pathol*. 2007 Feb;38(2):308-14.
419. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1276-80.
420. Regamey N, Tamm M, Wernli M, Witschi A, Thiel G, Cathomas G, et al. Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med*. 1998 Nov 5;339(19):1358-63.
421. Thauinat O, Mamzer-Bruneel MF, Agbalika F, Valensi F, Venditto M, Lebbe C, et al. Severe human herpesvirus-8 primary infection in a renal transplant patient successfully treated with anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):3009-10.
422. Andreoni M, Sarmati L, Nicastrì E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, et al. Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children. *Jama*. 2002 Mar 13;287(10):1295-300.
423. Kasolo FC, Spinks J, Bima H, Bates M, Gompels UA. Diverse genotypes of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) identified in infant blood infections in African childhood-KS and HIV/AIDS endemic region. *J Med Virol*. 2007 Oct;79(10):1555-61.
424. Chen T, Hudnall SD. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod Pathol*. 2006 May;19(5):726-37.
425. Martinez-Vazquez C, Potel C, Angulo M, Gonzalez-Carrero J, Alvarez M, Tenorio A, et al. Nosocomial Kikuchi's disease—a search for herpesvirus sequences in lymph node tissues using PCR. *Infection*. 2001 May-Jun;29(3):143-7.
426. Weinberg A, Spritzler J, Nokta M, Schrier R, Landay A, Brown D, et al. In vitro cell-mediated immune responses of human immunodeficiency virus-infected and -uninfected individuals to whole cytomegalovirus antigens and their subunits. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Sep;15(9):1398-409.
427. Sungkanuparph S, Manosuthi W, Kiertiburanakul S, Vibhagool A. Initiation of antiretroviral therapy in advanced AIDS with active tuberculosis: clinical experiences from Thailand. *J Infect*. 2006 Mar;52(3):188-94.
428. Huang G, Yan Q, Wang Z, Chen X, Zhang X, Guo Y, et al. Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease. *Int J Oncol*. 2002 Jul;21(1):31-6.
429. Koreishi A, Saenz AJ, Arcila ME, Hedvat C, Fleming S, Teruya-Feldstein J. Synchronous Follicular Lymphoma, Kaposi Sarcoma, and Castlemann's Disease in a HIV-Negative Patient With EBV and HHV-8 Coinfection. *Int J Surg Pathol*. 2009 Aug 5.



430. Shirokov D, Kadyrova E, Anokhina M, Kondratyeva T, Gourtsevich V, Tupitsyn N. A case of HHV-8-associated HIV-negative primary effusion lymphoma in Moscow. *J Med Virol.* 2007 Mar;79(3):270-7.
431. Mack AA, Sugden B. EBV is necessary for proliferation of dually infected primary effusion lymphoma cells. *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):6963-8.
432. Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG, Said JW, Asch AS, Knowles DM, et al. 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 Oct 1;88(7):2648-54.
433. Cobo F, Hernandez S, Hernandez L, Pinyol M, Bosch F, Esteve J, et al. Expression of potentially oncogenic HHV-8 genes in an EBV-negative primary effusion lymphoma occurring in an HIV-seronegative patient. *J Pathol.* 1999 Oct;189(2):288-93.
434. Seliem RM, Griffith RC, Harris NL, Beheshti J, Schiffman FJ, Longtine J, et al. HHV-8+, EBV+ multicentric plasmablastic microlymphoma in an HIV+ Man: the spectrum of HHV-8+ lymphoproliferative disorders expands. *Am J Surg Pathol.* 2007 Sep;31(9):1439-45.
435. D'Antonio A, Boscaino A, Adesso M, Piris MA, Nappi O. KSHV- and EBV-associated germinotropic lymphoproliferative disorder: a rare lymphoproliferative disease of HIV patient with plasmablastic morphology, indolent course and favourable response to therapy. *Leuk Lymphoma.* 2007 Jul;48(7):1444-7.
436. Yin Q, Wang X, Fewell C, Cameron J, Zhu H, Baddoo M, et al. MicroRNA miR-155 inhibits bone morphogenetic protein (BMP) signaling and BMP-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J Virol.* 2010 Jul;84(13):6318-27.
437. Lacroix A, Jaccard A, Rouzioux C, Piguet C, Petit B, Bordessoule D, et al. HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma. *J Med Virol.* 2007 Sep;79(9):1349-56.
438. Kelly MJ, Benjamin LA, Cartwright K, Ajdukiewicz KM, Cohen DB, Menyere M, et al. Epstein-Barr Virus Coinfection in Cerebrospinal Fluid Is Associated With Increased Mortality in Malawian Adults With Bacterial Meningitis. *J Infect Dis.* 2011 Nov 9.
439. Berger C, Hug M, Gysin C, Molinari L, Frei M, Bossart W, et al. Distribution patterns of beta- and gamma-herpesviruses within Waldeyer's ring organs. *J Med Virol.* 2007 Aug;79(8):1147-52.
440. Qin D, Feng N, Fan W, Ma X, Yan Q, Lv Z, et al. Activation of PI3K/AKT and ERK MAPK signal pathways is required for the induction of lytic cycle replication of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus by herpes simplex virus type 1. *BMC Microbiol.* 2011;11:240.
441. Oskay T, Karademir A, Erturk OI. Association of anticonvulsant hypersensitivity syndrome with Herpesvirus 6, 7. *Epilepsy Res.* 2006 Jul;70(1):27-40.
442. Lennette ET, Busch MP, Hecht FM, Levy JA. Potential herpesvirus interaction during HIV type 1 primary infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005 Oct;21(10):869-75.
443. Simbiri KO, Murakami M, Feldman M, Steenhoff AP, Nkomazana O, Bisson G, et al. Multiple oncogenic viruses identified in Ocular surface squamous neoplasia in HIV-1 patients. *Infect Agent Cancer.* 2010;5:6.
444. Balfour HH, Jr., Holman CJ, Hokanson KM, Lelonek MM, Giesbrecht JE, White DR, et al. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis.* 2005 Nov 1;192(9):1505-12.
445. Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP, Pavese P, Baccard M, Gemi R, et al. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis.* 2005 Mar 15;191(6):985-9.
446. Kersten MJ, Klein MR, Holwerda AM, Miedema F, van Oers MH. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell responses in HIV-1 infection: different kinetics in patients progressing to opportunistic infection or non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1525-33.
447. Legoff J, Amiel C, Calissonni O, Fromentin D, Rajoely B, Abuaf N, et al. Early impairment of CD8+ T cells immune response against Epstein-Barr virus (EBV) antigens associated with high level of circulating mononuclear EBV DNA load in HIV infection. *J Clin Immunol.* 2004 Mar;24(2):125-34.
448. Piriou ER, van Dort K, Nanlohy NM, Miedema F, van Oers MH, van Baarle D. Altered EBV viral load setpoint after HIV seroconversion is in accordance with lack of predictive value of EBV load for the occurrence of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):6931-7.



449. Newton R, Carpenter L, Casabonne D, Beral V, Babiker A, Darbyshire J, et al. A prospective study of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Epstein-Barr virus in adults with human immunodeficiency virus-1. *Br J Cancer*. 2006 May 22;94(10):1504-9.
450. de Sanjose S, Bosch R, Schouten T, Verkuijlen S, Nieters A, Foretova L, et al. Epstein-Barr virus infection and risk of lymphoma: immunoblot analysis of antibody responses against EBV-related proteins in a large series of lymphoma subjects and matched controls. *Int J Cancer*. 2007 Oct 15;121(8):1806-12.
451. Paramita DK, Fachiroh J, Haryana SM, Middeldorp JM. Evaluation of commercial EBV RecombLine assay for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Virol*. 2008 Aug;42(4):343-52.
452. Gu AD, Lu LX, Xie YB, Chen LZ, Feng QS, Kang T, et al. Clinical values of multiple Epstein-Barr virus (EBV) serological biomarkers detected by xMAP technology. *J Transl Med*. 2009;7:73.
453. Tao Q, Srivastava G, Chan AC, Chung LP, Loke SL, Ho FC. Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J Med Virol*. 1995 Jan;45(1):71-7.
454. Tao Q, Srivastava G, Dickens P, Ho FC. Detection of Epstein-Barr virus-infected mucosal lymphocytes in nasal polyps. *Am J Pathol*. 1996 Oct;149(4):1111-8.
455. Zheng YM, Cain YL, Cheng JR, Li J, Mo YK, Gao JQ, et al. [Evaluation of detection of Epstein-Barr virus Rta/IgG in nasopharyngeal carcinoma]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2009 Aug;23(4):285-7.
456. Zhan SB, Zhong JM, Mai ZP, Ye SQ, Zhou L, Zeng Y, et al. [Improve on serological diagnosis method of nasopharyngeal carcinoma]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2009 Feb;23(1):65-7.
457. Cai YL, Zheng YM, Cheng JR, Li J, Mo YK, Zhong QY. [Evaluation of combined determinations of Epstein-Barr virus antibodies for nasopharyngeal carcinoma assessed with receiver operating characteristic curve based on logistic regression]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2009 Oct;23(5):384-7.
458. Delforge ML. [On the usefulness of serology testing in infectious diseases: selected topics]. *Rev Med Brux*. 2011 Sep;32(4):285-8.
459. Schubert S, Abdul-Khaliq H, Lehmkuhl HB, Yegitbasi M, Reinke P, Kebelmann-Betzig C, et al. Diagnosis and treatment of post-transplantation lymphoproliferative disorder in pediatric heart transplant patients. *Pediatr Transplant*. 2009 Feb;13(1):54-62.
460. Dharmidharka VR, Araya CE. Post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Nephrol*. 2009 Apr;24(4):731-6.
461. Pajand O, Pourakbari B, Mahjob F, Aghamohammadi A, Mamishi N, Mamishi S. Detection of Epstein-Barr virus DNA in plasma and lymph node biopsy samples of pediatric and adult patients with Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011 Feb;28(1):10-5.
462. Machado AS, Da Silva Robaina MC, Magalhaes De Rezende LM, Apa AG, Amoedo ND, Bacchi CE, et al. Circulating cell-free and Epstein-Barr virus DNA in pediatric B-non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2010 Jun;51(6):1020-7.
463. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med*. 1999 Aug 16;190(4):567-76.
464. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5419-28.
465. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol*. 2008 Sep-Oct;18(5):305-19.
466. Vanhentenrijk V, Vanden Bempt I, Dierickx D, Verhoef G, Wlodarska I, De Wolf-Peeters C. Relationship between classic Hodgkin lymphoma and overlapping large cell lymphoma investigated by comparative expressed sequence hybridization expression profiling. *J Pathol*. 2006 Oct;210(2):155-62.



467. Hennard C, Pfuhl T, Buettner M, Becker KF, Knofel T, Middeldorp J, et al. The antibody 2B4 directed against the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1) detects MAGE-4: implications for studies on the EBV association of human cancers. *J Pathol.* 2006 Aug;209(4):430-5.
468. Zeytinoglu A, Hekimgil M, Erensoy S, Aydemir S, Berber S, Cagircan S, et al. [Investigation of Epstein-Barr virus DNA and RNA in tissues of patients with lymphoma]. *Mikrobiyol Bul.* 2005 Oct;39(4):473-81.
469. Valdez H, Smith KY, Landay A, Connick E, Kuritzkes DR, Kessler H, et al. Response to immunization with recall and neoantigens after prolonged administration of an HIV-1 protease inhibitor-containing regimen. ACTG 375 team. AIDS Clinical Trials Group. *AIDS.* 2000 Jan 7;14(1):11-21.
470. Luciano AA, Lederman MM, Valentin-Torres A, Bazdar DA, Sieg SF. Impaired induction of CD27 and CD28 predicts naive CD4 T cell proliferation defects in HIV disease. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3543-9.
471. Lacroix A, Collot-Teixeira S, Mardivirin L, Jaccard A, Petit B, Pigué C, et al. Involvement of Human Herpesvirus-6 Variant B in Classic Hodgkin's Lymphoma via DR7 Oncoprotein. *Clin Cancer Res.* 2010 Oct 1;16(19):4711-21.
472. Bosch Princep R, Lejeune M, Salvado Usach MT, Jaen Martinez J, Pons Ferre LE, Alvaro Naranjo T. Decreased number of granzyme B+ activated CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the inflammatory background of HIV-associated Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol.* 2005 Oct;84(10):661-6.
473. 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 May;181(5):1562-8.
474. Whitby D, Marshall VA, Bagni RK, Wang CD, Gamache CJ, Guzman JR, et al. Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J Gen Virol.* 2004 Jan;85(Pt 1):155-63.
475. Kasolo FC, Monze M, Obel N, Anderson RA, French C, Gompels UA. Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *J Gen Virol.* 1998 Dec;79 (Pt 12):3055-65.
476. Kajumbula H, Wallace RG, Zong JC, Hokello J, Sussman N, Simms S, et al. Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology.* 2006;49(3):133-43.
477. Zong J, Ciufo DM, 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 Jan;23(3):119-48.
478. Cassar O, Blondot ML, Mohanna S, Jouvion G, Bravo F, Maco V, et al. Human herpesvirus 8 genotype E in patients with Kaposi sarcoma, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2010 Sep;16(9):1459-62.
479. Hernandez DE, Masquelier B, Perez O, Oliver M, Fleury HJ. Human herpesvirus 8 variants in Venezuelan patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Clin Infect Dis.* 2003 Feb 1;36(3):385-6.
480. Nascimento MC, Wilder N, Pannuti CS, Weiss HA, Mayaud P. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2005 May;33(1):52-9.
481. Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Tregouet DA, Joubert M, Tortevoe P, et al. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet.* 2000 Sep 23;356(9235):1062-5.
482. White T, Hagen M, Gudza I, White IE, Ndemera B, Gwanzura L, et al. Genetic diversity of the Kaposi's sarcoma herpesvirus K1 protein in AIDS-KS in Zimbabwe. *J Clin Virol.* 2008 Jun;42(2):165-71.
483. Gazouli M, Papaconstantinou I, Zavos G, Metaxa-Mariatou V, Nasioulas G, Boletis J, et al. Human herpesvirus type 8 genotypes in iatrogenic, classic and AIDS-associated Kaposi's sarcoma from Greece. *Anticancer Res.* 2004 May-Jun;24(3a):1597-602.
484. Serwin AB, Mysliwiec H, Wilder N, Schwartz RA, Chodyncka B. Three cases of classic Kaposi's sarcoma with different subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Int J Dermatol.* 2006 Jul;45(7):843-6.



485. D'Antonio A, Adesso M, Memoli D, Liguori P, Cuomo R, Boscaino A, et al. Lymph node-based disease and HHV-8/KSHV infection in HIV seronegative patients: report of three new cases of a heterogeneous group of diseases. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):795-801.
486. Chadburn A, Hyjek E, Mathew S, Cesarman E, Said J, Knowles DM. KSHV-positive solid lymphomas represent an extra-cavitary variant of primary effusion lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2004 Nov;28(11):1401-16.
487. Knowles DM, Inghirami G, Ubriaco A, Dalla-Favera R. Molecular genetic analysis of three AIDS-associated neoplasms of uncertain lineage demonstrates their B-cell derivation and the possible pathogenetic role of the Epstein-Barr virus. *Blood*. 1989 Feb 15;73(3):792-9.
488. Knowles DM. Etiology and pathogenesis of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003 Jun;17(3):785-820.
489. Simonelli C, Spina M, Cinelli R, Talamini R, Tedeschi R, Gloghini A, et al. Clinical features and outcome of primary effusion lymphoma in HIV-infected patients: a single-institution study. *J Clin Oncol*. 2003 Nov 1;21(21):3948-54.
490. Chen YB, Rahemtullah A, Hochberg E. Primary effusion lymphoma. *Oncologist*. 2007 May;12(5):569-76.
491. Nonami A, Yokoyama T, Takeshita M, Ohshima K, Kubota A, Okamura S. Human herpes virus 8-negative primary effusion lymphoma (PEL) in a patient after repeated chylous ascites and chylothorax. *Intern Med*. 2004 Mar;43(3):236-42.
492. Ueda K, Ito E, Karayama M, Ohsaki E, Nakano K, Watanabe S. KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 9;394(3):482-7.
493. Fan W, Bubman D, Chadburn A, Harrington WJ, Jr., Cesarman E, Knowles DM. Distinct subsets of primary effusion lymphoma can be identified based on their cellular gene expression profile and viral association. *J Virol*. 2005 Jan;79(2):1244-51.
494. Xu D, Coleman T, Zhang J, Fagot A, Kotalik C, Zhao L, et al. Epstein-Barr Virus Inhibits Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication in Primary Effusion Lymphomas. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):6068-78.
495. Jiang Y, Xu D, Zhao Y, Zhang L. Mutual Inhibition between Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Epstein-Barr Virus Lytic Replication Initiators in Dually-Infected Primary Effusion Lymphoma. *PLoS ONE*. 2008;3(2):e1569.
496. Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Said J, et al. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood*. 1996 Jul 15;88(2):645-56.
497. Karcher DS, Alkan S. Human herpesvirus-8-associated body cavity-based lymphoma in human immunodeficiency virus-infected patients: a unique B-cell neoplasm. *Hum Pathol*. 1997 Jul;28(7):801-8.
498. Valencia ME, Martinez P, Moreno V, Laguna F, Lahoz JG. AIDS-related body cavity-based lymphomas, herpesvirus-8 and HIV infection: a study of seven cases. *Aids*. 1999 Dec 24;13(18):2603-5.
499. Ascoli V, Signoretti S, Onetti-Muda A, Pescarmona E, Della-Rocca C, Nardi F, et al. Primary effusion lymphoma in HIV-infected patients with multicentric Castleman's disease. *J Pathol*. 2001 Feb;193(2):200-9.
500. Boulanger E, Hermine O, Femand JP, Radford-Weiss I, Brousse N, Meignin V, et al. Human herpesvirus 8 (HHV-8)-associated peritoneal primary effusion lymphoma (PEL) in two HIV-negative elderly patients. *Am J Hematol*. 2004 May;76(1):88-91.
501. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Goedert JJ, Engels EA. Pleural and peritoneal lymphoma among people with AIDS in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Apr 1;29(4):418-21.
502. Wang X, Wang H, He B, Hui Y, Lv G, Li L, et al. Virological and molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus strains from Xinjiang, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jan;31(1):53-9.
503. Jalilvand S, Tomesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Naraghi ZS, Shoja Z, et al. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 variants in Kaposi's sarcoma from Iranian patients. *Virus Res*. 2011 Sep 22.



504. 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 Dec 10;93(25):14862-7.
505. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer*. 2010 Oct;10(10):707-19.
506. 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 Jul 9;13(10):1165-76.
507. 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 Oct;82(Pt 10):2393-404.
508. Tomkowicz B, Singh SP, Lai D, Singh A, Mahalingham S, Joseph J, et al. Mutational analysis reveals an essential role for the LXXLL motif in the transformation function of the human herpesvirus-8 oncoprotein, kaposin. *DNA Cell Biol*. 2005 Jan;24(1):10-20.
509. Zhang D, Pu X, Wu W, Jin Y, Juhear M, Wu X. Genotypic analysis on the ORF-K1 gene of human herpesvirus 8 from patients with Kaposi's sarcoma in Xinjiang, China. *J Genet Genomics*. 2008 Nov;35(11):657-63.
510. Marcelin AG, Motol J, Guihot A, Caumes E, Viard JP, Dussaix E, et al. Relationship between the quantity of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in peripheral blood and effusion fluid samples and KSHV-associated disease. *J Infect Dis*. 2007 Oct 15;196(8):1163-6.
511. Casper C. Defining a role for antiviral drugs in the treatment of persons with HHV-8 infection. *Herpes*. 2006 Aug;13(2):42-7.
512. 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 Dec;71(4):548-56.



ANEXO 1

NOVEDAD CIENTÍFICA

- Aporta nuevas evidencias sobre la participación de los HVs en las infecciones del SNC en pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 a pesar de la introducción de la TARVAE.
- Se muestran evidencias que reafirman la naturaleza sistémica de la infección por HVH-8 tanto en individuos con SK-SIDA como en contactos asintomáticos infectados y no infectados por el VIH-1.
- Aporta nuevos datos sobre la patogenia de la infección del HVH-8 y demuestra el papel de la saliva en su transmisión tanto mediante la saliva de pacientes con SK-SIDA, de contactos asintomáticos de pacientes con SK-SIDA y de pacientes con Síndrome Adénico.
- Se realiza el primer reporte de transmisión intrafamiliar del HVH-8 en Cuba.
- Permitió reconocer la existencia de otros cofactores que inciden en la evolución de la infección por el HVH-8 en Cuba: efecto de la raza, la orientación sexual, efectores de la respuesta inmune, subtipo viral y CV del HVH-8.
- Por primera vez se evalúa la frecuencia de HVs linfotropos en ganglios linfáticos y muestras de saliva de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico.
- Por primera vez se realiza la caracterización clínica, anatomopatológica y virológica del Síndrome Adénico en individuos cubanos seropositivos al VIH-1.
- Los resultados de la CV del VEB resaltan el origen infeccioso de los linfomas de células B de pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 y demuestran su utilidad como marcador de proceso linfoproliferativo.
- Se evidencia la participación de coinfecciones entre HVs, incluso con otros microorganismos, en la patogenia de algunas de las patologías que se diagnostican en individuos seropositivos al VIH, tanto de evolución aguda como en procesos tumorales.
- Se reafirma la presencia de varios subtipos del HVH-8 en Cuba, incluso se alerta sobre el incremento de la circulación de algunos de ellos, reconociéndose por primera vez su participación en procesos linfoproliferativos de pacientes seropositivos al VIH-1.

VALOR TEÓRICO PRÁCTICO

- Permitió introducir el diagnóstico del HVH-8 mediante q-RT-PCR en Cuba.
- Aporta evidencias sobre la transmisión de los HVs linfotropos mediante la saliva de pacientes seropositivos al VIH-1 con enfermedades asociadas al HVH-8, con Síndrome Adénico y en contactos asintomáticos.



- Se recomienda introducir la determinación de la CV de HVs linfotropos en el diagnóstico diferencial del Síndrome Adénico de pacientes seropositivos al VIH-1.

RECONOCIMIENTOS

- El estudio de la infección por HVs en el SNC de pacientes seropositivos al VIH-1 con SNI formó parte del Logro de la Academia de ciencias de Cuba, 2007. Título: Impacto de la infección por CMVh en individuos cubanos con diversas patologías. Resultó mención en el Concurso Central del Premio Anual de Salud, año 2009. Título: Papel de la infección por Citomegalovirus en individuos cubanos con diversas patologías.
- El estudio de la infección por HVH-8 en pacientes con SK-SIDA y sus contactos obtuvo 2do Lugar en XIII Jornada Científica de Médicos Residentes de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí; 2007. Obtuvo Mención la categoría Tesis en el XXXIV Concurso premio anual de la salud 2009 (Nivel Provincial). Título: Carga viral del Herpesvirus humano 8 en individuos con Sarcoma de Kaposi epidémico y sus contactos: implicaciones en la transmisión y patogenia de la infección. Fue seleccionado como Resultado Relevante a nivel Institucional y posteriormente se aprobó como logro de la Academia de Ciencias de Cuba, en el año 2011. Título: Aportes al conocimiento sobre la patogenia, transmisión y caracterización molecular del HVH-8, 2005-2009.

PUBLICACIONES

1. **Martínez PA**, Díaz R, González D, Oropesa L, González R, Pérez L, Viera J; and Kourí V. The effect of highly active antiretroviral therapy on outcome of central nervous system herpesviruses infection in Cuban human immunodeficiency virus–infected individuals. *J of NeuroVirology* 2007;13:1-6.
2. **Martínez PA**, Kourí V. Mechanisms of transmission of human Herpesvirus 8: a current challenge. *Rev Biomed* 2008; 19:170-178.
3. **Martínez PA**; Muné M; Soto Y; Ramírez R; Correa C; Alfonso M; Kourí V. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8. *Rev Cub Med Trop.* 2009; 61 (2)
4. **Martínez PA** and Kourí V; Blanco O; Capó V; Rodríguez ME; Dovigny MC; Cardellá L; Gala A; Jiménez NA; Luzardo C; Correa C; Alemán Y; Pérez L; Álvarez A, Hengge U. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus load in asymptomatic contacts of Cuban Epidemic KS patients. *Archives of Virology* 2010; 155 (12):1971.
5. **Martínez PA** and Kouri V; Capó V; Rodríguez ME; Dovigny MC; Cardellá L; Gala A; Jiménez NA; Luzardo C; Correa C; Alemán Y; Pérez L; Álvarez A, Hengge U. Simultaneous quantification of



Human Herpesvirus 8 DNA by real time PCR in different tissues of HIV infected Cuban patients with Kaposi's sarcoma. *Herpesviridae* 2010, 1:3.

6. **Martínez, PA**, V. Kouri, Y. Aleman, O. Blanco, V. Capó, M.E. Rodríguez, M. Dovigny, L. Cardellá, A. Gala, N. Jiménez, C. Luzardo, C. Correa, L. Pérez, A. Alvarez, U. Hengge. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in AIDS-KS Cuban individuals and its relation with HHV-8 load: evidence of subtype B expansion. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010; 16 Sup No. 2, Page S335.

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

- Sexta Jornada Internacional de Infectología Pediátrica 2006.
 1. Meningoencefalitis por Herpesvirus en pacientes cubanos, período 2001-2005. (Presentaciones en Cartel)
- VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical 2007; Habana, Cuba.
 1. Cartel No. 279. Impacto de la TARVAE en la evolución de la Infección del SNC causada por Herpesvirus en individuos cubanos seropositivos al VIH-1.
- XIII Jornada Científica de Médicos Residentes de Microbiología. IPK, Mayo 2007.
 1. Carga Viral del HASK en diferentes fluidos de pacientes VIH con Sarcoma de Kaposi y sus contactos. (Presentación Oral).
 2. Meningoencefalitis por Herpesvirus en pacientes cubanos, período 2001-2005. (Presentación Cartel).
- Convención CPHEM 2008. Jornada Provincial de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical.
 1. Carga viral del Herpesvirus Asociado al Sarcoma de Kaposi en individuos con SK Epidémico y sus contactos, implicaciones en la transmisión y patogenia de la infección. (Presentación Cartel).
- Congreso 70 aniversario del IPK, VII congreso cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso nacional de Medicina Tropical. Havana, Cuba. 2009.
 1. Carga viral del Herpesvirus humano 8 en individuos con Sarcoma de Kaposi epidémico y sus contactos: implicaciones en la transmisión y patogenia de la infección. (Presentación Cartel)
 2. Simposio ITS: Sarcoma de Kaposi y virus del Herpes humano 8 en Cuba. (Presentación Oral)
- Congreso Oncología Habana 2009.
 1. Carga viral del Herpesvirus humano 8 en individuos con Sarcoma de Kaposi epidémico y sus contactos: implicaciones en la transmisión y patogenia de la infección. (Presentación Cartel)
- Quinto Encuentro de Distribuidores de Latinoamérica de QIAGEN. Cuba, 2010.



-
1. Utilidad del PCR en Tiempo Real para la cuantificación del virus de Epstein Barr en pacientes cubanos con Síndrome adénico. (Presentación Oral)
- 20 Congreso Europeo de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Viena, Austria. 10 al 13 Abril, 2010.
 1. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in AIDS-KS Cuban individuals and its relation with HHV-8 load: Evidence of subtype B expansion. (Presentación Cartel)
 - 16to Taller Internacional de Bioinformática en evolución viral y epidemiología molecular. Baltimore, Rockville, EUA. 29 de Agosto al 3 Septiembre.
 1. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in AIDS-KS Cuban individuals and its relation with HHV-8 load: Evidence of subtype B expansion. (Presentación Cartel)
 - InmunoPerú 2012, 29 de Mayo - 2 de Junio, Perú, 2012.
 2. The usefulness of lymphotropic Herpesviruses DNA quantification for differential diagnosis of peripheral lymphadenopathies among Cuban HIV infected individuals. (Presentación Cartel)
- Además, parte de los resultados que se muestran en el presente documento integraron trabajos de terminación de residencia [1 Microbiología (2007); 1 Oncología, (2012)] y una tesis de maestría en Enfermedades Infecciosas (2011), todas discutidas satisfactoriamente.



ANEXO 2

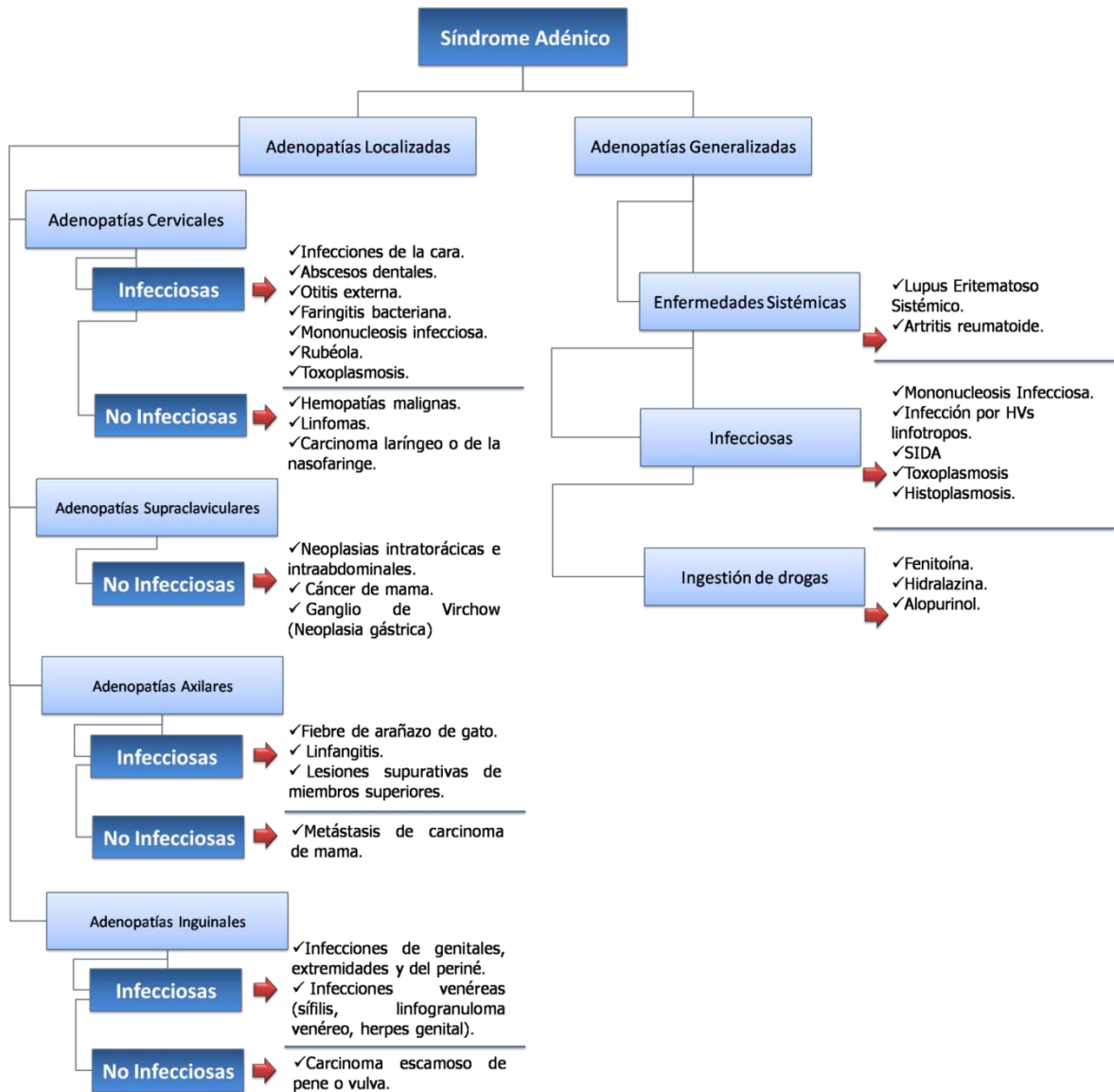
Enfermedades asociadas con la infección por HVs

Herpesvirus	Enfermedad que producen
VHS 1 y 2	Herpes simple orolabial (gingivostomatitis herpética)
	Herpes simple genital
	Herpes simple en la piel
	Queratoconjuntivitis herpética
	Herpes simple neonatal: enfermedad localizada en la piel, ojos y boca; encefalitis con o sin toma de la piel; Infección diseminada
	Meningoencefalitis herpética
VZV	Varicela Zoster
	Herpes Zoster
	Varicela congénita, neonatal, postnatal
	Meningoencefalitis por Varicela
CMVh	Síndrome Febril
	Enfermedad similar a la Mononucleosis
	Infección severa por CMV en inmunocompetentes: enteritis, enfermedad trombótica, anemia hemolítica, trombocitopenia, encefalitis, neuropatías, miocarditis, enfermedad ocular
	Infección congénita por CMV
	Infección por CMV en inmunodeprimidos (VIH+, receptores de trasplante, etc): amplio espectro de enfermedades, desde cuadros febriles autolimitados hasta enfermedad multisistémica.
HHV-6	Exantema Súbito
	Enfermedad Febril con o sin exantema
	Síndrome Mononucleósico
	Enfermedad de Kikuchi-Fujimoto.
	Otras enfermedades: hepatitis fulminante, neumonitis intersticial, meningoencefalitis, enfermedades autoinmunes, esclerosis múltiple, síndrome de fatiga crónica
HHV-7	Convulsión febril
	Síndrome Mononucleósico
	Síndrome febril
VEB	Síndrome febril
	Mononucleosis infecciosa
	Linfomas de células B (LNH, LH, Linfoma de Burkitt, etc)
	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X
	Linfomas de células T y de células asesinas naturales
	Carcinoma nasofaríngeo
	Carcinoma gástrico y linfopiteliomas
	Tumores del músculo liso (leiomiomas)
Leucoplasia vellosa	
Infección crónica activa por VEB	
HHV-8	Enfermedades linfoproliferativas post-trasplante
	Síndrome Hemofagocítico
	Variantes clínicoepidemiológicas del SK (clásico, endémico, iatrogénico, epidémico o asociado a SIDA)
	Linfoma de efusión primario (LEP)
	Enfermedad Multicéntrica de Castleman (EMC)
Trastornos linfoproliferativos	



ANEXO 3

Principales causas de Síndrome Adénico





ANEXO 4

Carta de Consentimiento Informado

Por medio de la presente certifico que el Dr:_____ me ha informado sobre los estudios que se me realizarán como parte del Estudio "Título del estudio". Los resultados de dichos estudios serán utilizados y publicados de forma anónima pudiendo Yo en cualquier momento abandonar dichas investigaciones, sin que ello pueda repercutir desfavorablemente en mi asistencia médica en un futuro. Del mismo modo certifico que participaré en dicho estudio de una forma absolutamente voluntaria, teniendo derecho a conocer los resultados del examen a mi realizado.

Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias nacionales y/ó extranjeras, al comité ético a que consulten los informes hospitalarios que posean mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y Apellidos del paciente:

Firma del paciente:

Nombre y Apellidos del testigo:

Firma del testigo:

Fecha:

Yo:_____ responsable del Protocolo de Investigación certifico por medio de la presente haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria en el ensayo.

Fecha:_____ Firma:_____



ANEXO 5

Recolección de datos individuales de pacientes con SNI x HVs

Nombre _____ Edad _____ Sexo _____

Lugar de residencia _____ Raza _____ HC _____

Fecha Inicio de Síntomas _____

APP: _____

Síntomas: (Especificaciones al dorso)

Fiebre (Sí) ___ (No) ___ Cefalea (Sí) ___ (No) ___ Vómitos (Sí) ___ (No) ___

Fotofobia (Sí) ___ (No) ___ Convulsiones (Sí) ___ (No) ___

Signos Meníngeos (Sí) ___ (No) ___ Signos de Foc. Neur. (Sí) ___ (No) ___

Coma (Sí) ___ (No) ___

Lesiones herpéticas oral/genital (Sí) ___ (No) ___

Fecha de aparición _____

LCR:

Fecha de Extracción _____ LCR Claro _____ LCR Traumático _____

Conteo de células _____ Predominio _____ Tratamiento antes de extracción del LCR (Sí) ___ (No) ___ Medicamento (antivirales) _____

Tratamiento Antivírico (Nombre) _____ Frecuencia _____

Duración _____ Respuesta Terapéutica _____

Estadía Hospitalaria _____

Estado al Egreso: Fallecido (fecha) _____ Mejorado _____

Causa de muerte:

Secuelas Neurológicas al egreso (Sí) ___ (No) ___

Sólo para pacientes VIH:

SIDA (Sí) ___ (No) ___ conteo de CD4 _____ CV VIH _____

Antiretrovirales (Sí) ___ (No) ___



ANEXO 6

Recolección de datos individuales de pacientes con SK-SIDA

Nombre: _____

Edad: _____ Color de la Piel: _____ Sexo: _____

Orientación Sexual: _____

Internacionalista: _____ País: _____

Fecha VIH: _____ Fecha Sida: _____

Tto ARV: _____ Fecha: _____

Medicamentos: _____

Otros Antivirales: _____ Fecha _____

Otros tto anti KS _____ Fecha _____

CD4: _____ CD8: _____

CV: _____

Fecha Diagnóstico KS: _____

Localización de la Lesión: _____

Fecha: _____

Tipo de KS:

Cutáneo: _____ Cutáneomucoso: _____

Visceral: Órganos afectados _____

Histología de la Lesión/ Biopsia:

SK Inflamatorio: _____ SK Proliferativo/Vascular: _____ SK Tumoral: _____

LEP: _____

Otros Diagnósticos: _____

Contactos Sexuales: _____ Contactos

Intradom: _____



ANEXO 7

Recolección de datos individuales de los contactos de pacientes SK-SIDA

Nombre y Apellidos: _____

Número de Caso Índice: _____

Lugar de Residencia: _____

Edad: _____

Sexo: _____

Color de la piel: _____

Orientación sexual: _____

Contacto de: _____

Conteo de CD4: _____

Carga viral de VIH: _____

Hallazgos al Examen Físico:



ANEXO 8

Recolección de datos individuales de pacientes con Síndrome Adénico

Nombre: _____
HC: _____ Edad: _____ Sexo: _____ Raza: _____
Hospital de Procedencia: _____
APP: _____
APF: _____
Inf.Cron: _____

Cáncer Familiar: _____

Fecha de admisión: _____ Fecha de 1ros sint: _____

Síntomas: Astenia _____ Anorexia _____ Fiebre _____ Perd. Peso: _____

Sudor: _____ Trast. Neurológicos: _____

Otros: _____

Examen Físico: Adenopatías: _____ Hepatomegalia: _____ Ictero: _____

Esplenomegalia: _____ Les. Piel: _____

Otros: _____

Características Adenopatías: _____

BAFF: SI _____ NO: _____ RESULTADO: _____

LABORATORIO CLÍNICO

Hb: _____ Hto.: _____ PLAQ: _____ LEUCO: _____

Diferencial: _____ Lámina Periférica: _____

CAN: _____ CD4: _____ Serología VDRL: _____ TGP: _____

TGO: _____

FA: _____ GLIC: _____ CREAT: _____ A.URICO: _____

LDH: _____ Serología VIH: _____

IMAGENOLOGIA

US REGIONAL: _____

US. ABDOMINAL: _____

RX. TORAX: _____

TAC: _____

Cultivos Microbianos: _____

TOMA DE MUESTRA

Fecha de toma de muestras: _____

DIAGNOSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO

H/E: _____

IHQ:

CD45: _____ CD30: _____ CD20: _____ CD3: _____ LMP-1: _____

Otros: _____

DIAGNOSTICO VIROLÓGICO:

Marcadores serológicos

VEB: IgM VCA: _____ IgG VCA: _____ IgG EBNA: _____

HVH-6: IgG: _____

CMVh: IgM: _____ IgG: _____

PCR cuantitativo en tejido:

HVH-8: _____

CMVh: _____

VEB: _____

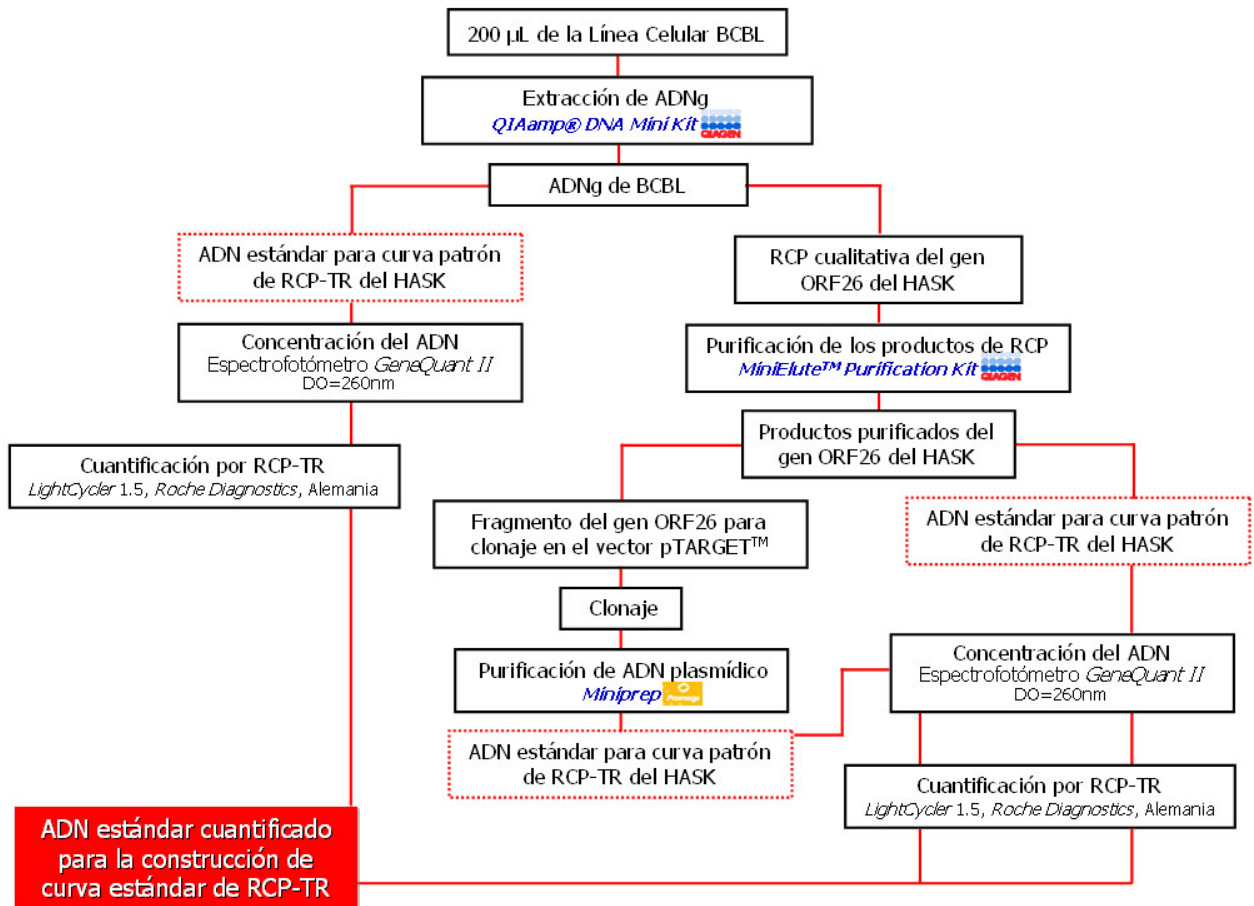
HVH-6: _____

Otros datos de interés:



ANEXO 9

Flujo de trabajo que se siguió para la obtención de los ADN estándares



Abreviaturas: BCBL: *Body Cavity-Based Lymphoma*; ADN: Ácido desoxirribonucleico; ADNg: ADN genómico; RCP-TR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real; HASK: Herpesvirus Asociado a Sarcoma de Kaposi; ORF: *Open Reading Frame*; DO: Densidad Óptica.

ANEXO 10

Principales manifestaciones clínicas que se detectaron en pacientes cubanos seropositivos al VIH-1 con Síndrome Adénico según el diagnóstico histopatológico (2009-2010).

		LNH N=14		LH N=7		LR N=17		LG N=6		SK N=3		HLTV N=2	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Adenopatías	Localizadas	11	78.6	4	57.1	14	82.4	3	50	3	100	2	100
	Generalizadas	3	21.4	3	42.9	3	17.6	3	50	-	-	-	-
Localización Anatómica de las adenopatías	Cervicales	6	42.9	4	57.1	10	58.8	2	33.3	2	66.7	2	100
	Inguinales	2	14.3	-	-	1	5.9	-	-	1	33.3	-	-
	Supradaviculares	-	-	-	-	-	-	1	16.7	-	-	-	-
	Generalizadas	3	21.4	3	42.9	3	17.6	3	50	-	-	-	-
	Retroauriculares	1	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Occipitales	1	7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Axilares	1	7.1	-	-	3	17.6	-	-	-	-	-	-
Visceromegalia	Hepatomegalia	1	7.1	1	14.3	4	25	3	50	-	-	1	50
	Esplenomegalia	2	14.3	-	-	-	-	1	16.7	-	-	-	-
	Hepato-esplenomegalia	4	28.6	2	28.6	-	-	2	33.3	-	-	-	-
	No visceromegalia	6	42.9	4	57.1	12	75	-	-	3	100	1	50
Fiebre	SI	4	30.8	1	14.3	8	47.1	5	83.3	1	33.3	2	100
	NO	9	69.2	6	85.7	9	52.9	1	16.7	2	66.7	-	-
Sudoración nocturna	SI	-	-	1	14.3	1	5.9	1	16.7	-	-	-	-
	NO	13	100	6	85.7	16	94.1	5	83.3	3	100	2	100
Astenia	SI	-	-	3	42.9	5	29.4	1	16.7	-	-	1	50
	NO	13	100	4	57.1	12	70.6	5	83.3	3	100	1	50
Conteo de linfocitos T CD4	<200 céls/mm ³	6	42.9	-	-	5	31.3	1	16.7	1	33.3	2	100
	>200 céls/mm ³	8	57.2	7	100	11	68.8	5	83.3	2	66.7	-	-
CV del VIH	<55 000 copias/mL	11	84.6	6	85.7	11	73.3	2	33.3	3	100	-	-
	>55 000 copias/mL	2	15.4	1	14.3	4	26.7	4	66.7	-	-	2	100

Fuente: Historias clínicas individuales, IPK