



DETECCION DEL VIRUS HERPES TIPO 8 MEDIANTE LA PRUEBA DE PCR EN MUESTRAS DE SARCOMA DE KAPOSI DE PACIENTES VIH POSITIVOS DE LA ESE HOSPITAL SIMON BOLIVAR DE LA CIUDAD DE BOGOTA

Area: Patología, categoría: pregrado
Modalidad: oral

GARJALES, D; PEÑA, Y; RAMIREZ, N.*
BALEN, G.**
CAYCEDO, M.***
MORENO, M. ****

RESUMEN

Objetivo determinar la presencia del VHH-8 en muestras de Sarcoma de Kaposi de pacientes VIH positivos del hospital Simón Bolívar de Bogotá

Método se realizó un estudio descriptivo transversal, tomando como población objeto 25 muestras en bloque de parafina con diagnóstico de Sarcoma de Kaposi de pacientes VIH positivos del Hospital Simón Bolívar de la ciudad de Bogotá; las cuales fueron analizadas en el laboratorio de virología de la universidad el Bosque mediante la prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) determinando la presencia o ausencia del virus herpes tipo 8 (VHH-8).

Resultados De las 25 muestras de pacientes VIH positivos con Sarcoma de Kaposi incluidos en el estudio la edad promedio de los pacientes 36.32 +/- 6.12 años, (rango de 27a 48 años). La preferencia sexual se asocia significativamente al estrato socioeconómico.

El sitio comúnmente más afectado es Boca y extremidades en los pacientes, en cavidad oral el sitio predominante era paladar duro, seguido de la lengua, paladar blando, labios.

Conclusión Los factores sociodemográficos estudiados de los pacientes de ESE Hospital Simón Bolívar de la ciudad de Bogotá fueron significativos para el estudio. Los pacientes con virus herpes tipo 8 tienen un nivel de carga más bajo que quienes no lo presentan. Se presenta el virus herpes 8 en el 48% (12) de los pacientes con sarcoma de Kaposi.

Palabras claves: Sida, Sarcoma de Kaposi, Virus Herpes tipo 8, Prueba de PCR

ABSTRACT

Aim The aim of this study is to determine the presence of the VHH-8 in Kaposi's Sarcoma in patients HIV positive of the ESE Simon Bolivar Hospital of Bogotá.

Method: A transversal descriptive study was carried out in 25 blocks of paraffin study samples diagnosed with Kaposi's Sarcoma in HIV positive patients of the ESE Simon Bolivar Hospital of Bogotá. These were analyzed in a virology lab of the University El Bosque using a PCR test determining the presence or absence of the herpes virus type 8 (VHH-8).

Results: Of the 25 samples of HIV positive patients with Kaposi's Sarcoma included in this study, the average age was 36.32 +/- 6.12 years old (range of 27 to 48 years). The sexual preference is significantly associated to the socioeconomic status.

The most affected area is mouth and extremities. In the oral cavity the most common place was hard palate, followed by tongue, soft palate and lips.

Conclusions: The sociodemographic factors studied were significant for this study.

The patients with herpes virus type 8 have a lower load level than those without the virus. The herpes virus type 8 was present in 48% (12) of the patients with Kaposi's Sarcoma.

Clue Words: Aids, Kaposi's Sarcoma, Herpes Virus type 8, PCR Test.

* Estudiante de pregrado

** Asesora Científica

*** Asesora Metodológica

**** Asesora Estadística

INTRODUCCION

El Sarcoma de Kaposi (SK) es la neoplasia más común en los individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Durante mucho tiempo el Sarcoma de Kaposi ha sido objeto de estudio de diversos grupos europeos, en estas investigaciones se ha asociado el virus tipo 8 (VHH-8) con el Sarcoma de Kaposi.

En Colombia aun no se ha realizado estudios que apoyen dicha teoría, por esta razón cabe preguntar ¿Esta el virus herpes tipo 8 (VHH-8) en muestras de Sarcoma de Kaposi de pacientes con inmunodeficiencia adquirida de la ESE Hospital Simón Bolívar de la ciudad de Bogotá?

El Sarcoma de Kaposi es un tumor vascular de piel y otros órganos; se presenta en forma de maculas, placas y nódulos de color rojo, púrpura a pardo azul.⁽¹⁾

Su clasificación se da en cuatro formas SARCOMA CLASICO, caracterizado por una manifestación lenta sobre piernas o piel, en hombres entre la quinta y séptima década de vida con descendencia italiana (mediterráneo). SARCOMA AFRICANO, no se encuentra al VIH, se presenta como una neoplasia endémica en pacientes menores de 25 años. SARCOMA DE TRANSPLANTE, se presenta en algunos pacientes que reciben terapia inmunosupresora con fármacos previa a transplante de órganos para prevenir el rechazo de los mismos. SARCOMA ASOCIADO AL SIDA, epidémico se presenta como la principal causa de mortalidad en las personas VIH positivas. La mayoría de pacientes fallece a causa de las complicaciones infecciosas oportunistas del SIDA y no por las consecuencias directas de SK.⁽²⁾

Esta neoplasia se presenta en cuatro estadios de la enfermedad. ESTADIO I forma cutánea limitada (menos de 10 lesiones o afección de un área anatómica). ESTADIO II forma cutánea diseminada (mas de 10 lesiones o afección de un área anatómica). ESTADIO III afección únicamente visceral. ESTADIO IV afección cutánea y visceral o afección pulmonar; los ESTADIOS III y IV presenta hemorragias internas.⁽²⁾

Se presenta frecuentemente lesiones orales en el paladar que es le sitio mas común, pero también se presenta en la encía, lengua y orofaringe; usualmente es asintomático, pueden dificultar el habla y la deglución.

Aproximadamente un 90% de todos los hombres VIH positivos homosexuales o bisexuales están infectados con el Virus Herpes Asociado al Sarcoma (VHSK), mientras que solo el 3% VIH positivos receptores de transfusiones o hemofílicos tienen el virus, en lo respecta a las mujeres heterosexuales CIH positivos solo el 4% están infectadas con VHSK.

Esta investigación tiene como objetivo determinar la presencia del VHH-8 en muestras de Sarcoma de Kaposi de pacientes VIH positivos de la ESE Hospital Simón Bolívar de Bogotá y se realizó con el fin de aportar evidencia a la asociación del VHH-8 con la etiología del Sarcoma de Kaposi en muestras de Sarcoma de Kaposi de pacientes VIH positivos de la ESE Hospital Simón Bolívar de Bogotá, dicha presento interés en emprender una línea de investigación en Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Se realizo un estudio descriptivo transversal. El objeto de estudio fue la relación del VHH-8 con el Sarcoma de Kaposi. Se tomo como población 25 muestras en bloque parafina con diagnostico de Sarcoma de Kaposi de pacientes VIH positivos de la ESE Hospital Simón Bolívar de Bogotá en periodos comprendidos entre 2004-2006.

Teniendo en cuenta como criterio de inclusión muestras en bloque con diagnostico de Sarcoma de Kaposi de pacientes VIH, homosexuales y bisexuales mayores de edad que reciben tratamiento en la ESE Hospital Simón Bolívar de Bogotá, los criterios de exclusión fueron muestras con diagnostico diferente a Sarcoma de Kaposi y menores de edad. Las variables estudiadas fueron edad, estado civil, estrato socioeconómico, preferencia sexual, presencia del virus herpes tipo 8, localización de la lesión, numero de lesiones, estadio de la enfermedad.

Se realizó previo informe en la ESE Hospital Simón Bolívar de Bogotá, se presentó el protocolo de proyecto de investigación, el cual fue evaluado por el comité de investigaciones científicas y ética del hospital y por medio del acta N° 23 fue aprobado.

El Hospital Simón Bolívar Empresa Social del Estado ESE presta servicios de III y IV Nivel logrando un alto nivel de desarrollo técnico y científico en sus diferentes servicios asistenciales; Dentro de los logros más significativos está el fortalecimiento del proyecto de diagnóstico de VIH/SIDA, del que es institución líder en Bogotá.

Se asistió a consulta dermatología, se revisó el registro de patología del cual se sacó la información de los 25 pacientes a los cuales se les había realizado la biopsia la cual arrojó un diagnóstico SK.

Se radicaron dos oficios uno para solicitud de muestras en bloque de parafina las cuales estaban almacenadas en una bodega, rotuladas por fecha de realización de la biopsia, en el laboratorio de patología del Hospital; y el otro oficio dirigido a la coordinación de archivos para la revisión de historias clínicas, las cuales coincidían con los números de registro de los bloques de parafina, dichas historias fueron revisadas y la información de cada paciente fue consignada en el instrumento de recolección de datos clínicos.

Los 25 bloques de parafina fueron llevados al laboratorio de virológica de la universidad de El Bosque de Bogotá, los cuales fueron desparafinados con el fin de obtener solo la muestra del SK siguiendo un protocolo para la extracción de DNA en bloques de parafina.⁽³⁾ Tomando dos secciones de 15 µm a partir de bloques parafinados por medio de un micrótopo y se colocaron en un tubo de 1.5 ml.

EXTRACCIÓN DE DNA

Se adicionó 1 ml de xilol, se mezcló por inversión e incubó a 55 °C por 15 minutos. se llevó a centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante repitiendo el procedimiento, luego se adicionó etanol al 100% 90% 80% y 70% e incubó por 15 minutos a 55°C para centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos y

descartar posteriormente el sobrenadante (se repitió este proceso entre cada porcentaje de Etanol), se secó el pellet al aire por 15 minutos y se adicionó 1 mg/ml de proteinasa K en 500 µl buffer de digestión. Se incubó toda la noche en agitación a 55°C con proteinasa K (1 mg/ml) se repitió este paso hasta obtener una solución acuosa, de color transparente.

PURIFICACION DE ADN

Se adicionó un volumen igual de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1) a la solución acuosa obtenida por digestión con proteinasa K. para Centrifugar a 6500 rpm por 10 minutos. Y remover la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril.

PRECIPITACION DEL ADN

Se agregaron 3 volúmenes de etanol al 100 % (Frío) a la solución de reacción y 1/10 de Acetato de Sodio 3 M al volumen final de la solución, para mezclar por vórtex e Incubar por 1 hora a - 70°. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos y posteriormente descartar el sobrenadante se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Y centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos nuevamente se Descartó el sobrenadante y se dejó secar completamente se resuspendió en -50 µl en agua grado I estéril y se almacenó a - 20 °C.

SELECCIÓN DE LOS PRIMERS

Una vez el ADN se encuentra puro y en condiciones de procesar, se realiza el diseño y selección de los primers, se tomó como referencia una publicación de sociedad Americana de Investigaciones de patología y la asociación de patología Molecular.⁽⁴⁾ en donde 31 muestras de DNA fueron recuperadas del banco del laboratorio molecular de patología, departamento de DNA de patología, universidad médica de Weill de la universidad de Cornell, en dicha publicación se realizaron pruebas de PCR para detectar VHH-8 en muestras de Sarcoma de Kaposi mediante la utilización de diferentes Primers con el fin de seleccionar y unificar los primers mas confiables en la detección del VHH-8 estos

fueron ORF-26in que amplia secuencias de ADN de 136 pares de bases (pb) y ORFK9-3 que amplia secuencias de 184 pb.

PRUEBA DE PCR

Una vez obtenido y purificado el DNA de cada muestra de Sarcoma de Kaposi y seleccionados los PRIMERS se realizaron dos pruebas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) una para la enzima GAPDH que participa en el metabolismo de la glucosa en todas las células humanas y se utiliza como prueba de control para determinar las condiciones del DNA que se extrajo de cada muestra y de esta manera poder realizar la prueba de PCR específica para determinar la presencia o ausencia del virus la cual hace uso de los PRIMERS seleccionados.

La PCR se realiza en tres fases.

FASE I La PCR maneja dos oligonucleotidos sintéticos entre ellos "Primers" que actúan como cebadores en síntesis in Vitro del DNA a altas temperaturas se crea la Tag Polimerasa que es la enzima catalizadora.

FASE II Desnaturalización, el ADN se debe obtener en cadena sencilla y romper los puentes de hidrogeno, esto se consigue mediante la elevación de la temperatura entre 90° - 95°C.

FASE III Hibridación, ya en esta fase se disminuye la temperatura entre 40° a 60°C permitiendo la unión de los primers. Finalmente los nucleótidos se incorporan al extremo de la cadena utilizando el molde del ADN previamente desnaturalizado, llevando a temperaturas de 72°C en donde la Tag Polimerasa alcanza su máxima actividad.

Después de realizar cada una de las pruebas, los resultados deben ser analizados por electroforesis que es una técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular y carga eléctrica, para la separación se usa un gel de agarosa al 2%. Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla, por la que las pequeñas se

moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

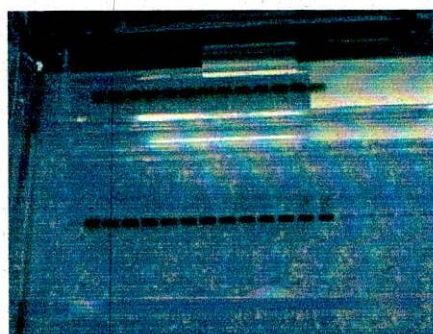
Fig 1. Equipo de electroforesis.



En cada pozo se sembró 10 microlitos de ADN, 2 microlitros de buffer 6X (el cual da peso molecular a la solución y tiene colorante) y un marcador de peso molecular.

Entre las muestras se coloca una negativa como control para garantizar la confiabilidad de la prueba esta muestra negativa se localiza en el pozo cinco de cada prueba, se conecta la maquina de electroforesis se deja correr durante 1 hora a 80 Voltios.

Fig. 2 Siembra de los pozos en el gel de agarosa al 2%



Una vez el tiempo requerido se cumple se procede a hacer la lectura de los resultados colocando el gel de agarosa en una planta de luz ultravioleta

Fig. 3 Lectura en luz ultravioleta.

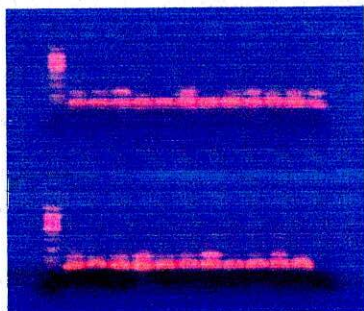


Fig. 4 Lectura de la prueba de control GAPDH

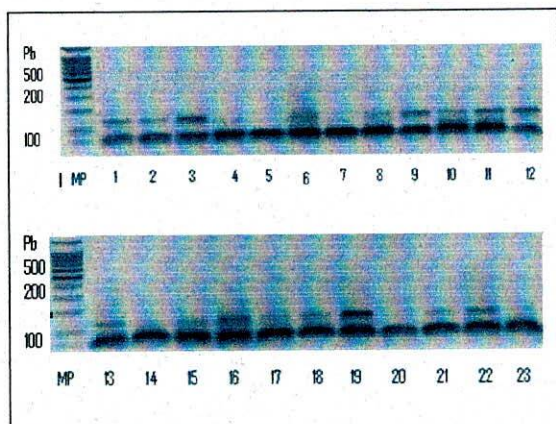


Fig. 5 Lectura de la PCR específica

Para la lectura de la PCR específica se sembraron dos pozos por cada muestra, el primer pozo hace referencia a la prueba con el Primer ORF26-in y el segundo para el ORF9-3.

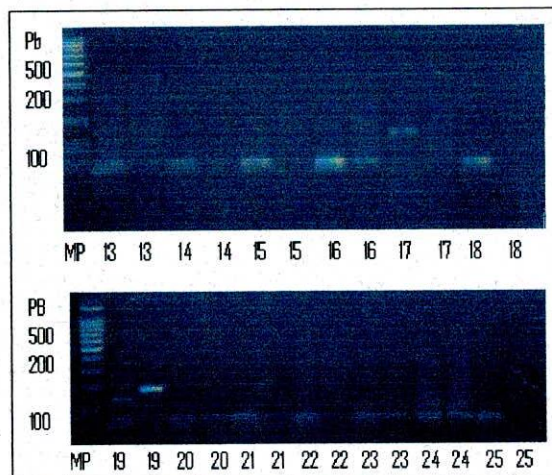
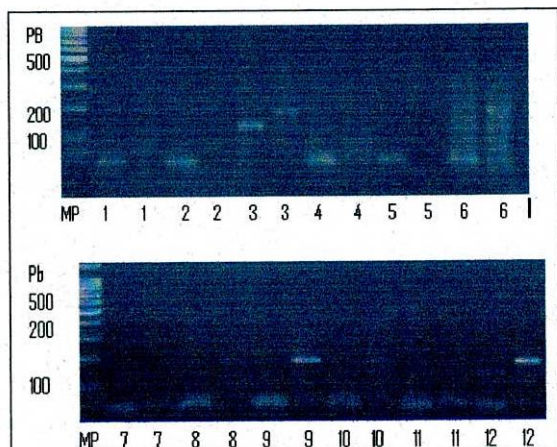


Tabla 1 Resultados de pruebas de PCR

NUME	PRIMERS TAMAÑO DE AMPLIFICACION			PRESENCIA DE VHH-8
	GAPDH 124 Pb	ORF26IN 136 Pb	ORFK9-3 184PB	
1	++	-	+	+
2	+	-	-	-
3	+++	+++	++	+
4	+	-	+	+
5	-	-	-	-
6	++	-	++	+
7	-	-	-	-
8	++	-	+	+
9	+++	-	+++	+
10	+	-	+	+
11	+++	-	-	-
12	+++	+	+++	+
13	+	-	-	-
14	-	-	-	-
15	+	-	-	-
16	++	-	+	+
17	+	++	+	+
18	+	-	-	-
19	+++	++	+++	+
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-
22	++	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	+++	-	+	+

Una vez obtenidos los resultados de laboratorio de cada muestra se procedió al diligenciamiento del instrumento de recolección de datos de laboratorio.

Los resultados obtenidos se tabularon en Excel y se interpretaron y analizaron mediante el programa estadístico SPSS versión 12 que realizó una estadística descriptiva de cada una de las variables, también se efectuaron los análisis divariados mediante los cuales se realizó el cruce de variables.

RESULTADOS

La muestra fue compuesta por 25 pacientes VIH positivos con edad promedio de 36.32 +/- 6.12 años, (rango de 27 a 48 años).

GRAFICO1: ESTRATO SOCIOECONOMICO DE LOS PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI VIH POSITIVOS DE LA ESE HOSPITAL SIMON BOLIVAR DE BOGOTA

El estrato predominante es el 2 con el 60% de los pacientes, seguido del 3 por el 24% y el 1 con el 16%.

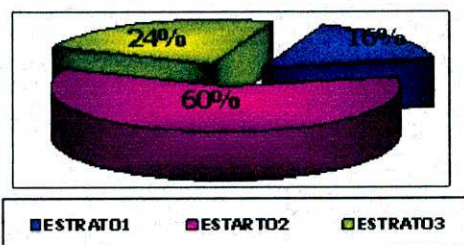


GRAFICO 2: ESTADO CIVIL DE LOS PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI VIH POSITIVOS DE LA ESE HOSPITAL SIMON BOLIVAR DE BOGOTA

El 96% de los pacientes son solteros y solo el 4% viudos.

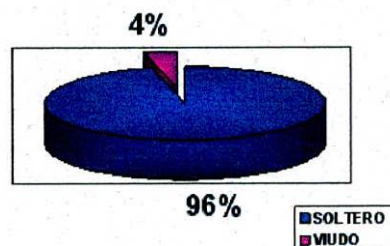


GRAFICO 3: ESTADIO DE LA ENFERMEDAD DE LOS PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI VIH POSITIVOS DE LA ESE HOSPITAL SIMON BOLIVAR DE BOGOTA

El estadio de la enfermedad en el 40% de los pacientes es III, es IV en el 36% de ellos y II en el 16%, solo en el 8% e estadio estadio es I.

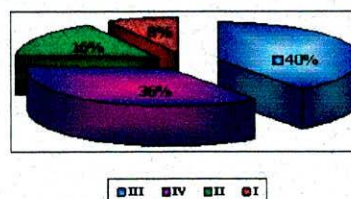
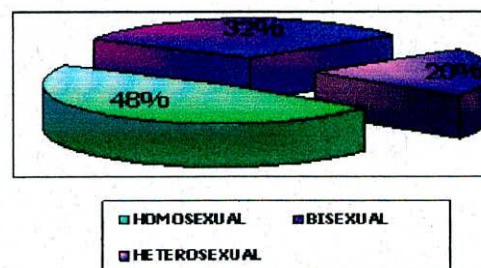


GRAFICO 4 TENDENCIA SEXUAL DE LOS PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI VIH POSITIVOS DE LA ESE HOSPITAL SIMON BOLIVAR DE BOGOTA

El 48% son homosexuales, el 32% bisexuales y el 20% heterosexuales.



En promedio los pacientes tienen 3.72 lesiones, las cuales se presentan en un rango de 1 a 9. El número de lesiones más frecuente es "1" presentada por el 24% de los pacientes, el 20% presentan 3 y 6 lesiones y el 12% 4 lesiones.

La localización de la lesión mas frecuente es Boca y extremidades en el 24% de los pacientes, Boca (lengua, paladar duro o blando, labios) en el 20% de ellos y boca, cara y cuello en el 16% de los pacientes.

GRAFICO 5: ASOCIACION DE ESTRATO Y PREFERENCIA SEXUAL

Según la prueba Chi-cuadrado la preferencia sexual se asocia significativamente al estrato socioeconómico ($P=0.02$),

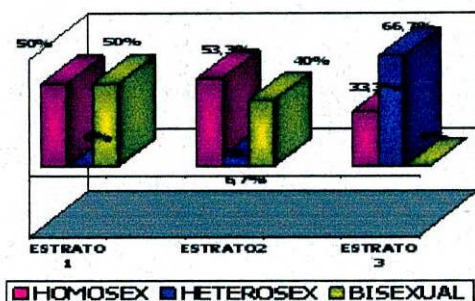


GRAFICO 7: PRESENCIA DE VHH-8

Se presenta el virus herpes 8 en el 48% de los pacientes con sarcoma de Kaposi.

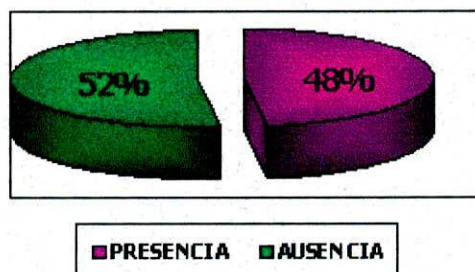


Grafico 7 PRESENCIA DEL VIRUS HERPES TIPO 8 SEGÚN ESTRATO SOCIOECONOMICO

En el estrato 1 y 3 predominan los pacientes que presentan el virus; con el 75% y 90% respectivamente. Mientras que en los estratos 2 y 4 la presencia es del 46,7% en el estrato 2 y de 33.3% en el estrato 4



Se encuentran significativamente correlacionados numero de lesiones y localización de la lesión (66.2%) y numero de lesiones con estadio de la enfermedad (53.5%)

DISCUSIÓN

De acuerdo al estudio retrospectivo, realizado por Ilan Lager , y col. De Oral and maxillofacial pathology se encontró que la mayoría de los pacientes estaban en la tercera (27%) o cuarta (44%) década de vida, según la relación de genero asociado al estudio fue de 46 hombre y 35 mujeres afectados y los sitios intraorales mas frecuentemente afectados fueron el paladar (37 pacientes), la lengua (20 pacientes) y la encía (20 pacientes).

En nuestro estudio la edad promedio fue de 36.32 +/- 6.12 años (segunda y cuarta década de vida), la muestra total fue en un 100% comprendida por hombres, en los que la localización mas frecuente de las lesiones al igual que el estudio en mención fue en paladar duro.

Según Robert Yarchoan, M. D en su publicación The New England Journal of medicine del 2007 afirme que las células del sarcoma de kaposi se encuentran siempre infectadas por el VHH-8 sin embargo en nuestra investigación encontramos que este tipo virus estuvo presente solo en el 48% de las muestras de Sarcoma de kaposi analizadas.

CONCLUSIONES

Relacionar los factores sociodemográficos con el objeto de estudio fue de gran importancia ya que permitió una globalización más certera en la Población del VIH que maneja la ESE Hospital Simón Bolívar de la ciudad de Bogotá.

El estrato socioeconómico 2, los pacientes solteros y homosexuales de la ESE Hospital Simón Bolívar de la ciudad de Bogotá presentan mayor incidencia de Sarcoma kaposi.

Solo el 48% de los pacientes VIH positivos con diagnóstico de Sarcoma de Kaposi presentan VHH-8 existe la probabilidad de que el virus no se encontrara en algunas de las muestras debido a la terapia antirretroviral.

RECOMENDACIONES

Iniciar líneas de investigación alternas y complementarias a esta investigación, con el fin de determinar los factores y causas que inciden en la presencia o ausencia del virus herpes tipo 8 (VHH-8) en el Sarcoma de Kaposi que presentan los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en la ESE Hospital Simón Bolívar de la ciudad de Bogotá que presenta una línea abierta par investigaciones que aporten información de importancia a este tema. de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA).

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. BENNETT, Goldman. WALKER, K. Tratado de medicina interna. Mc Graw Hill Interamericana. España. Ed. 21° 2002. pag. 2082-2098.
2. [Hptt://www.ctv.es/USER/fpardo/vihk.ap.ht](http://www.ctv.es/USER/fpardo/vihk.ap.ht)
3. Martinez C, Jiménez G, Castellanos J, Aporte del laboratorio en el diagnóstico postmortem de un caso fulminante de neumonía por virus Varicela Zoster. Acta de biología Colombiana facultada de Ciencias departamento Biología U nacional Vol 11 N- 2 2006
4. Langxing Pan y col Polymerase Chain Reaction Detection of Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus-Optimized Protocols and Their Application to Myeloma, Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 3, No. 1, February 2001 Copyright © American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology
5. KUMAR, COTRAN, ROBBINS. Patología Humana. Elsevier. Madrid-Barcelona. Ed. 7° 2004. pag. 147-158, 428, 544-545, 786.
6. HARRISON. Principios de medicina. c Graw Hill Interamericana. España. Ed. 15° 2002. pag. 2164-2173.
7. LAGER, Ilan, y col. Oral Kaposi's Sarcoma: A clinicopathologic study from South Africa. Oral Surg Oral Med Oral pathol. 2003;96:701-10
8. SCOTT, L, y col. Use of a multiantigen detection algorithm for diagnosis of Kaposi' s sarcoma-associated herpesvirus infection. Journal of clinical microbiology. Vol 44. No. 10
9. YARCHOAN, Robet, M.D. Key Role for a Viral Lytic Gene in Kaposi' s Sarcoma. The new England Journal of Medicine. 2006. 355;13