

ESTUDIOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

Implicación del virus herpes humano tipo 8 en la etiopatogenia del sarcoma de Kaposi

Resumen.—En 1994, Chang y cols. descubrieron la presencia de ADN de un nuevo tipo de virus herpes (VHH-8, VHSK) en el SK. Desde entonces numerosos trabajos han confirmado estos resultados, detectando este genoma vírico en todas las variantes clínicas de SK. El objetivo de nuestro estudio fue el determinar si en nuestra población también existía la asociación entre el VHH-8 y el SK.

Material y métodos: Se estudian mediante PCR la presencia de ADN del VHH-8 en biopsias cutáneas de 57 casos de SK (46 SK-SIDA, 8 SK clásico y 3 SK asociado a inmunosupresión). También se incluyeron en el estudio: 22 biopsias de piel sana de pacientes afectos por SK, 11 de tumores cutáneos no SK en pacientes VIH, 10 de tumores cutáneos de pacientes trasplantados, seis de angiosarcomas y otras 10 de piel sana de adultos normales.

Resultados: Se detectaron secuencias de ADN del VHH-8 en 45/57 casos de SK (36/46 SK-SIDA, 8/8 SK clásico, 1/3 SK asociado a inmunosupresión). La detección también fue positiva en 3/22 biopsias de piel sana de pacientes afectos por SK, así como en el dermatofibroma asociado a SIDA que se incluyó. El resto de las muestras fueron negativas.

Conclusiones: En este estudio se demuestra que la asociación, previamente descrita entre el VHH-8 y el SK existe en la población estudiada (un área de Valencia). La detección de ADN del VHH-8 es específica del SK. Pensamos que el VHH-8 es un factor importante en la etiopatogenia del SK.

Palabras clave: Sarcoma de Kaposi. Virus Herpes humano tipo 8. Angiosarcoma. Tumores cutáneos epiteliales.

M.^ª PINO GIL MATEO
ISABEL FEBRER BOSCH
EDUARDO LEDESMA
ADOLFO ALIAGA BONICHE
Servicio de Dermatología.
Hospital General Universitario.
Valencia.

Correspondencia:

M.^ª PINO GIL MATEO. Apartado de Correos 188.
38700 Santa Cruz de la Palma.

Aceptado el 15 de junio de 1999.

* Resumen de la tesis doctoral que obtuvo el accésit del Premio SmithKline Beecham, S. A., 1999.

INTRODUCCIÓN

El sarcoma de Kaposi (SK) es un tumor vascular conocido desde finales del siglo pasado (1). La investigación de su etiopatogenia adquirió gran interés a partir de 1981, cuando se describió en asociación al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), convirtiéndose en una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de dicha enfermedad (2). Desde hace más de 20 años se piensa que algún virus está implicado en la patogenia del SK, y existen evidencias epidemiológicas de que este virus podría ser transmitido vía sexual (3). Son numerosos los agentes infecciosos

a los que se ha intentado atribuir un papel en el desencadenamiento de las lesiones de SK, entre ellos: citomegalovirus (4), virus papiloma humano tipo 16 (5), virus herpes humano tipo 6 (6), mycoplasma penetrans (7) y virus BK (8).

En 1994, Chang y cols. descubrieron la presencia de ADN de un nuevo tipo de virus herpes en muestras cutáneas de SK (VHSK o VHH-8) que presentaba gran homología con los virus herpes saimiri y Epstein-Barr. Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtuvieron una positividad del 93% en las muestras de SK analizadas (9). Tras este primer

estudio en tan sólo 3 años ha habido una lluvia de trabajos que utilizando la misma secuencia de ADN descrita por Chang y cols. han intentado aclarar el papel real de este virus en las distintas formas clínicas de SK. En todos ellos la detección fue positiva en un importante número de casos, confirmado la asociación del VHH-8 con las otras formas clínicas de SK: SK clásico (Huang y cols., 87,5% de positividad) (10), SK endémico (Chang y cols., 89% de positividad) (11) y SK iatrogénico (Rady y cols., 100% de positividad) (12).

Posteriormente se han realizado numerosos estudios que han intentado la detección de ADN del VHH-8 en otro tipo de muestras: células mononucleares de sangre periférica (13), fluido obtenido del lavado bronquioalveolar (BAL) (14), saliva (15), esputo, frotis faríngeo, semen y heces (13), en un intento de averiguar la vía de transmisión del virus. La detección de ADN del VHH-8 en células mononucleares de sangre periférica predice la aparición posterior de SK (Whitby, 1995) (13) y también podría ser de utilidad en la monitorización del tratamiento y progresión clínica de la enfermedad (Shingadia, 1995) (16). Se detecta ADN del virus en el fluido obtenido del BAL en la mayoría de pacientes con afectación pulmonar (Howard, 1995) (14). La detección fue negativa en las muestras de saliva, esputo, frotis faríngeo y heces (Whitby, 1995) (13). Sin embargo, sí se detectó ADN del VHH-8 en muestras de semen (aunque los porcentajes variaron en los diferentes estudios), confirmando que el virus responsable del SK se transmitiría por vía sexual (Lin, 1995) (17).

El VHH-8 también ha sido detectado en otras neoplasias como linfomas basados en las cavidades corporales (Cesarman, 1995) (18). Enfermedad de Castleman multicéntrica (Soulier, 1995) (19), tumores cutáneos epiteliales de pacientes trasplantados renales (Rady, 1995) (20), algunas lesiones linfoproliferativas cutáneas (Sander, 1996) (21) y algún caso de angiosarcoma e hiperplasias angiolinefoides con eosinofilia aislados (Gyulai, 1996) (22, 23). Por ello queda por determinar el espectro de neoplasias en el que el VHH-8 pueda intervenir como agente etiológico.

El objetivo de nuestro estudio fue el determinar si en nuestra población (un área de Valencia) también existe la asociación entre el VHH-8 y el SK, así como intentar aclarar si ese virus está presente en otro tipo de neoplasias, como los angiosarcomas y los tumores cutáneos epiteliales de pacientes inmunodeprimidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en primer lugar muestras congeladas y posteriormente muestras incluidas en parafina, ya que así se podía obtener un mayor número de muestras y podríamos efectuar comparaciones con otro ti-

po de tumores.

Entre las muestras congeladas había 15 biopsias de piel afecta por SK, ocho biopsias de piel sana de pacientes afectados por SK y seis biopsias cutáneas de pacientes controles positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Todas estas muestras se obtuvieron mediante punch biopsia de 4 mm y se guardaban en fresco en un contenedor de nitrógeno líquido a -70° C.

Entre las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina se incluyeron 33 casos de SK asociado a SIDA, seis casos de SK clásico, tres casos de SK asociado a inmunosupresión, 14 muestras de piel sana o con otra patología cutánea distinta del SK (en pacientes afectados por SK), 11 biopsias de tumores cutáneos no SK de pacientes VIH positivos, seis muestras de angiosarcomas, 10 de tumores cutáneos de pacientes trasplantados renales y 10 muestras de piel sana de personas sanas.

Material

Se revisan todas las historias clínicas de los pacientes con SK (cuyas muestras fueron incluidas en parafina) que han sido incluidos en el estudio. De cada una de ellas se extraen los siguientes datos: sexo, edad, factor de riesgo para la infección por el VIH, características clínicas del SK (número de lesiones, localización y tiempo de evolución), primera manifestación de SIDA, número de linfocitos CD4+ en el momento del diagnóstico del SK, año de diagnóstico del SK y tratamiento empleado para el SK.

Asimismo se revisan todas las biopsias cutáneas de los SK incluidos en el estudio, en cada una de ellas se mira en qué estadio histológico están.

Métodos

Método de desparafinación de las muestras

Se recuperaron las piezas de las biopsias incluidas en el estudio, y de cada una de ellas se realizó un corte de 20 micras. Cada una de ellas fue sometida al método de desparafinación descrito por Wright y Manos (24), y que consiste en:

- Añadir aproximadamente 1 ml de octano a cada tubo. Cerrar los tubos y mezclarlos a temperatura ambiental durante 30 minutos.
- Centrifugar durante 3-5 minutos con centrifugadora a alta velocidad para separar el tejido de cualquier residuo de parafina.
- Quitar el octano de cada tubo con una pipeta Pasteur. (En este paso se han de extremar las precauciones para impedir la pérdida de tejido, ya que en el caso de muestras antiguas el tejido puede estar fragmentado y se podría perder durante la extracción del octano).

- Repetir los pasos uno, dos y tres.
- Añadir a cada tubo aproximadamente 0,5 ml de etanol al 100%. Cerrar y mezclar.
- Realizar lo mismo que en el paso dos.
- Quitar el etanol como se hizo con el octano en el paso tres.
- Repetir los pasos cinco, seis y siete. Quitar el máximo de etanol posible con la pipeta.
- Secar las muestras añadiendo dos-tres gotas de acetona a cada tubo. Manteniendo los tubos abiertos, colocarlos en un baño de agua a 37-50° C que promueva la evaporación de la acetona.

Todo este proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación de las distintas muestras.

Método de detección del ADN del VHH-8

La detección de ADN del VHH-8 se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene tres pasos: la extracción del ADN, la amplificación del ADN y la visualización del ADN.

Extracción del ADN

Se obtuvieron cortes (1-2) de 20 micras del tejido de interés. Estos cortes fueron resuspendidos en un tampón de extracción (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL a pH = 8,3 que contenía 0,5% de Tween 20 y 400 µg/ml de proteinasa K). Tras incubar 1 hora a 56° C la proteinasa K fue inactivada calentando 10 minutos a 96° C.

Amplificación del ADN

Cinco microlitros de cada muestra de ADN fueron colocados en 50 microlitros de mezcla de reacción que contenía 10 mM de Tris-HCL pH=8,3, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCL, 100 µM de cada nucleótido, 100 pmol de cada oligonucleótido (secuencias KS1 y KS2, 5' TCCGTG-TTGTACGTCCAG 3' y 5' AGCCGAAAGGATTCCAC-CAT 3', que generan un fragmento de 233 pares de base) y dos unidades de Taq DNA polimerasa (Real, Adv).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Progene Techne, Durviz SL, España) programado para 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 10 segundos, annealing a 58° C durante 10 segundos y polimerización a 72° C durante 15 segundos, y un paso final de polimerización a 72° C durante 6 minutos.

Visualización del ADN

Veinte microlitros de cada producto amplificado fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3% (agarosa GN-10, Durviz SL, España) que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en tampón TBE y visualizado bajo luz ultravioleta.

Todas las muestras fueron realizadas por duplicado.

Estudio estadístico

Se utiliza la prueba del χ^2 (Chi cuadrado) para comparar los resultados entre los distintos grupos y ver si existe una asociación estadísticamente significativa entre la detección por PCR de secuencias de ADN del VHH-8 y el diagnóstico de SK. También se utiliza la corrección de Yates, ya que el número total es inferior a 200.

Posteriormente se realizó el cálculo de la odds ratio (OR) y el intervalo de confianza de la OR, ya que en los estudios de casos y controles ésta es la mejor manera de saber cuánto de más frecuente es la asociación entre el VHH-8 y el SK que en los grupos controles.

RESULTADOS

Resultados de las muestras congeladas (tabla I)

- 14/15 muestras de piel afecta por SK resultaron positivas (93,3%).
- 3/8 muestras de piel sana de pacientes afectos

TABLA I: RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS MUESTRAS CONGELADAS

Paciente/ año diagnóstico	Diagnóstico	Resultado
1/1995	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
2/1993	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
3/1995	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
4/1994	Sarcoma Kaposi clásico	Positivo
5	Control VIH+	Negativo
6/1993	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
6/1993	Piel sana perilesional (SK)	Positivo
7	Control VIH+	Negativo
8	Control VIH+	Negativo
9/1993	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
9/1993	Piel sana perilesional (SK)	Negativo
10/1995	Sarcoma Kaposi VIH	Negativo
11/1994	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
11/1994	Piel sana perilesional (SK)	Positivo
12/1995	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
3/1995	Piel sana perilesional (SK)	Positivo
13/1995	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
14/1995	Sarcoma Kaposi clásico	Positivo
14/1995	Piel sana perilesional (SK)	Negativo
14/1995	Piel sana distante (SK)	Negativo
15	Control VIH+	Negativo
16/1996	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
16/1996	Piel sana distante (SK)	Negativo
17/1996	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
17/1996	Piel sana (SK)	Negativo
18/1996	Sarcoma Kaposi vs Ang. bac.	Positivo
19/1996	Sarcoma Kaposi VIH	Positivo
20	Control VIH+	Negativo

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. SK: sarcoma de Kaposi. Ang. bac.: angiomatosis bacilar.

por SK fueron positivas (37,5%). Todas las muestras de piel sana positivas fueron tomadas de un área perilesional.

— Ninguna de las cinco muestras controles VIH + fue positiva (0%).

En una de las muestras (paciente número 18) no había seguridad en cuanto al diagnóstico clínico ni histológico, si se trataba de un SK o bien de un caso de angiomatosis bacilar, pero la detección de ADN del VHH-8 fue positiva, por lo que finalmente se realizó el diagnóstico de SK.

Resultados de las muestras congeladas (tabla II)

Datos clínicos de los pacientes con SK asociado a SIDA (tabla II)

La edad media de los pacientes con SK-SIDA fue de 40,6 años; la proporción entre varones y mujeres fue

de 31/2. El factor de riesgo más frecuente fue el homosexual (24 pacientes), aunque también habían desarrollado SK personas con otros factores de riesgo: ADVP (adictos a drogas por vía parenteral) seis, bisexual dos y DPR (donantes de plasma remunerados) uno; en tres pacientes el factor de riesgo era desconocido. El SK fue la primera manifestación de SIDA en el 54% de los pacientes, en un 20% fue la neumonía por *Pneumocistis carini* y en otro 20% la primera manifestación de SIDA era desconocida. El número medio de linfocitos CD4+ en el momento del diagnóstico del SK fue de 72 (10-280).

Datos clínicos de los pacientes con SK clásico

La edad media de los pacientes con SK clásico fue de 72 años, y la proporción entre varones y mujeres fue de cinco a uno. El número medio de linfocitos CD4+ en el momento del diagnóstico fue de 804 (240-

TABLA II: DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSI ASOCIADO A SIDA

Paciente/año diagnóstico	Sexo/Edad	Factor riesgo	Núm. de lesiones/tiempo de evolución	Primera manifestación del SIDA	CD4
1/1993	V/73	?	1/3 meses	Sarcoma de Kaposi	150
2/1995 (3)	V/32	Homosexual	+ de 25 /4 meses	Sarcoma de Kaposi	20
3/1993 (6)	V/68	Homosexual	+ de 25/1 año	Sarcoma de Kaposi	30
4/1993	V/41	Homosexual	15/6 meses	Neumonía PC	100
5/1987	V/37	Homosexual	6/5 meses	Neumonía PC	20
6/1990	V/28	Homosexual	14/6 meses	Neumonía PC	10
7/1986	V/61	Homosexual	8/4 meses	Sarcoma de Kaposi	120
8/1990	V/47	Homosexual	?	Sarcoma de Kaposi	?
9/1992	V/52	Homosexual	3/2 meses	Sarcoma de Kaposi	30
10/1995 (1)	V/32	Bisexual	1/2 meses	Sarcoma de Kaposi	80
11/1995 (10)	V/40	ADVP	12/4 meses	Sarcoma de Kaposi	?
12/1996 (16)	V/45	Homosexual	3/6 meses	Tuberculosis pulmonar	20
13/1992	V/39	Homosexual	24/3 meses	Neumonía PC	10
14/1992	V/38	Homosexual	15/2 meses	Sarcoma de Kaposi	?
15/1992	V/26	Homosexual	20/3 meses	Sarcoma de Kaposi	140
16/1991	V/34	ADVP homosexual	21/4 meses	Sarcoma de Kaposi	280
17/1996 (17)	V/56	Homosexual	1/1 año	Diarrea criptoperidium	16
18/1996 (18)	M/26	ADVP	2/1 mes	Sarcoma de Kaposi	187
19/1991	V/33	ADVP	15/3 meses	Sarcoma de Kaposi	?
20/1991	V/30	Homosexual	+ de 15/6 meses	Sarcoma de Kaposi	?
21/1993 (2)	V/49	Homosexual	10/4 meses	Sarcoma de Kaposi	30
22/1992	V/38	DPR	5/3 meses	Neumonía PC	30
23/1995	V/54	Homosexual		Neumonía PC	20
24/1995 (13)	V/33	Bisexual	+ de 15/3 meses	Sarcoma de Kaposi	50
25/1995 (12)	V/37	Homosexual	+ de 15/1 año	Sarcoma de Kaposi	200
26/1994 (11)	V/40	Homosexual	10/6 meses	?	?
27/1990					
28/1990					
29/1993	V/46	Homosexual	6/3 meses	?	?
30/1991	V/37	Homosexual		Neumonía PC	50
31/1991	V/30	Homosexual			
32/1991	V/40	Homosexual			
33/1996 (19)	M/35	ADVP	15/1 año		

Entre paréntesis se indica el número que ocupó el paciente en el estudio con muestras congeladas. V: varón. M: mujer. ADVP: adicto a drogas por vía parenteral. DPR: donante de plasma remunerado. Neumonía PC: neumonía por *Pneumocistis carini*. CD4: número de linfocitos CD4 en el momento del diagnóstico.

TABLA III: RESULTADO DE LA PCR PARA EL VHH-8 EN LAS MUESTRAS DE SK-SIDA INCLUIDAS EN PARAFINA

Núm. de paciente	Estadio histológico	Tratamiento	Año	PCR VHH-8
1	Nodular	Cirugía	1993	Positiva
2	Nodular	Quimioterapia	1995	Positiva
3	Parche	Quimioterapia	1993	Positiva
4	Placa	Quimioterapia	1993	Positiva
5	Placa	Radioterapia	1987	Negativa
6	Parche	?	1990	Negativa
7	Placa	Quimioterapia	1986	Negativa
8	Parche	Quimioterapia	1990	Negativa
9	Placa	Quimioterapia	1992	Positiva
10	Placa	Cirugía	1995	Positiva
11	Placa	Ninguno	1995	Positiva
12	Nodular	Radioterapia	1996	Positiva
13	Placa	Quimioterapia	1992	Positiva
14	Parche	?	1992	Positiva
15	Parche	Quimioterapia	1992	Negativa
16	Placa	?	1991	Positiva
17	Nodular	Radioterapia	1996	Positiva
18	Nodular	Cirugía	1996	Positiva
19	Nodular	?	1991	Positiva
20	Placa	QMT y RxT	1993	Positiva
21	Nodular	Quimioterapia	1993	Positiva
22	Placa	AZT	1992	Negativa
23	Placa	AZT	1995	Positiva
24	Nodular	Quimioterapia	1995	Positiva
25	Nodular	Quimioterapia	1995	Positiva
26	Parche	Quimioterapia	1994	Negativa
27	Placa	?	1990	Negativa
28	Parche	?	1990	Negativa
29	Nodular	?	1993	Positiva
30	Placa	?	1991	Positiva
31	Placa	Quimioterapia	1991	Positiva
32	Placa	Quimioterapia	1991	Positiva
33	Placa	Quimioterapia	1996	Positiva

QMT: quimioterapia. RxT: Radioterapia. AZT: cidovudina. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. VHH-8: virus herpes humano tipo 8.

1.200). Uno de los pacientes (número 6) presentaba una linfopenia CD4 en el momento del diagnóstico. Todos ellos eran VIH negativos.

Datos clínicos de los pacientes con SK asociado a inmunosupresión

Se incluyeron tres casos (dos varones y una mujer), la edad media fue de 57 años. El motivo de la inmunosupresión fue un linfoma, tratamiento con corticosteroides orales y quimioterapia.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en los pacientes con SK asociado a SIDA (tabla III)

De las 33 muestras analizadas, 24 eran positivas (72,7%) y nueve (27,2%) eran negativas. Llama la atención que las seis muestras que se incluyeron anteriores al año 1991 fueron negativas, mientras que las de

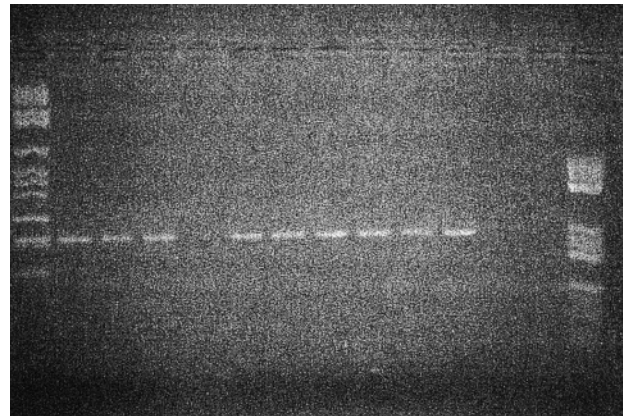


FIG. 1.—Detección de ADN del VHH-8 mediante PCR en 12 muestras de piel afectada por SK de individuos con SIDA (muestras en parafina). Las muestras 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 resultaron positivas. Las biopsias 4, 11 y 12 fueron negativas.

1991 en adelante, 24 de 27 (88,8%), eran positivas (tan sólo tres fueron negativas) (Fig. 1).

La detección de ADN del VHH-8 era positiva a pesar de que muchos de los pacientes estaban recibiendo quimioterapia y la enfermedad estaba estabilizada.

El ADN del VHH-8 estaba presente en todos los estadios histológicos del SK, si bien casi todas las muestras negativas que fueron obtenidas después del año 1990 correspondían a un estadio en parche.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en los pacientes con SK clásico

En los seis pacientes afectados por SK clásico se detectó ADN del VHH-8 (100%). Una de estas muestras fue la biopsia más antigua de todo el estudio (del año 1989) en que la detección fue positiva. En este grupo tampoco se observó influencia del tratamiento, ni del estadio histológico en la detección o no de ADN del VHH-8.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en los casos de SK asociado a inmunosupresión

Tan sólo uno de los tres casos resultó ser positivo, aquél cuya muestra fue recogida en el año 1991; las otras dos fueron recogidas en los años 1984 y 1989, respectivamente.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en las biopsias cutáneas de piel sana o con otra patología cutánea de pacientes con SK

Las 14 muestras de piel sana o con otra patología cutánea de los pacientes afectados por SK fueron negativas. De todas ellas tan sólo son valorables siete, ya que las otras siete son piezas muy antiguas, en las que la detección de ADN del VHH-8 en la piel afectada por SK también fue negativa. Entre las muestras incluidas

había ocho de piel sana, un molluscum contagioso, un herpes simple, una queratosis actínica, una leucoplasia vellosa oral, una úlcera herpética y una de poroqueratosis.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en muestras de tumores cutáneos (no SK) de pacientes VIH positivos

La edad media de los pacientes con tumores cutáneos no SK fue de 35 años. La proporción entre varones y mujeres fue de 8/3. El factor de riesgo más frecuente fue el homosexual, pero seguido muy de cerca por el ADVP y el heterosexual. Los tumores cutáneos incluidos fueron: seis carcinomas epidermoides, dos linfomas, un carcinoma basocelular, una queratosis actínica y una dermatofibroma. Todas las muestras habían sido obtenidas después del año 1989. En tan sólo el dermatofibroma se detectaron secuencias de ADN del VHH-8; ésta fue la única muestra no SK de todo el estudio que resultó ser positiva.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en biopsias cutáneas de tumores cutáneos de pacientes trasplantados renales

Todas las muestras fueron obtenidas de dos pacientes, e incluyeron: cinco carcinomas epidermoides, dos epitelomas basocelulares, un bowen, una verruga y una dermatofibroma. Todas ellas eran posteriores al año 1990 y ninguna de ellas fue positiva.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en las muestras de angiosarcoma

Se analizaron seis muestras, siendo todas ellas negativas.

Resultado de la PCR para el VHH-8 en las muestras de piel sana de individuos sanos

Se incluyeron 10 biopsias y en ninguna de ellas la detección fue positiva.

Análisis de los resultados

Con la prueba del χ^2 se efectuaron todas las comparaciones posibles entre el grupo de pacientes afectos por SK y el resto de grupos controles (pieles sanas de pacientes afectos, tumores cutáneos no SK de pacientes VIH positivos, tumores cutáneos no SK de pacientes trasplantados, angiosarcomas y piel normal de individuos sanos). En todos los casos se demostró que existía una asociación estadísticamente significativa entre la detección de ADN del VHH-8 y el SK con una $p < 0,001$.

Asimismo se realizó el cálculo de la OR utilizando como grupo de casos todas las piezas de SK, y como grupo de controles todas las piezas controles incluidas

en el estudio. Se obtuvo una OR de 135 y un intervalo de confianza de la OR (con un 95% de confianza) entre 16,67 y 1.081. Con ello también se constató la existencia de una asociación positiva entre el VHH-8 y el SK.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio, al igual que los numerosos publicados hasta la fecha (realizados en distintas áreas geográficas: Europa, EE.UU. y África), demuestra una asociación clara entre la detección del VHH-8 y el SK. Se detectaron secuencias de ADN del VHH-8 en el 74,4% del total de las muestras de SK incluidas en parafina. Si consideramos sólo las muestras obtenidas después del año 1990, el porcentaje asciende a un 90%. La mayor negatividad de las muestras antiguas podría ser debida a una pérdida de ADN por parte de ellas. Cuando analizamos por separado los distintos tipos de SK que fueron incluidos en nuestro trabajo, el porcentaje en que se detectaron secuencias de ADN del VHH-8 en las muestras posteriores al año 1990 fue del 88,8% para los casos de SK-SIDA, 100% para los SK clásicos y 100% para el único caso de SK asociado a inmunosupresión que se pudo incluir. El porcentaje de positividad obtenido en las muestras congeladas fue de un 92% para los casos de SK-SIDA y de un 100% para los SK clásicos. En nuestro trabajo las muestras incluidas en parafina dio un rendimiento similar a la congelada; esto no coincide con lo obtenido por otros autores como más adelante veremos.

En la **tabla IV** se recogen los resultados obtenidos por los principales estudios publicados sobre la detección de ADN del VHH-8 en biopsias de piel de las distintas formas clínicas de SK.

El primer estudio fue realizado en EE. UU. por Chang y cols. en 1994 con 27 casos de SK-SIDA. Se utilizaron muestras congeladas y se detectó positividad en un 93% de los casos. En este estudio también se detectó positividad en el 11% de los linfomas asociados a SIDA analizados. También se incluyeron otras biopsias que fueron utilizadas como controles (biopsias de cirugía plástica, tumores vasculares, etc.), y en ninguna de ellas la detección fue positiva (9).

A partir de este primer estudio numerosos grupos de trabajo han utilizado la misma secuencia de ADN descrita por Chang y cols., y han publicado los resultados que ellos han obtenido en las distintas formas clínicas de SK y en diferentes áreas geográficas. Así, Su y cols. recogen casos de SK en Taiwan, y detectan ADN del VHH-8 tanto en los SK-SIDA como en los SK clásicos (25). Posteriormente, Huang y cols. realizan otro estudio en New York en el que se incluyen 30 casos de SK, entre ellos 10 SK endémico. Se detectó positividad en un 70% de los casos de SK endémico (10). También se han realizado estudios en Europa (Francia, Italia y Bélgica), en todos ellos se obtuvieron resultados similares a los de los trabajos realizados en

TABLA IV: DETECCIÓN DE ADN DEL VHH-8 EN BIOPSIAS CUTÁNEAS DE SK. RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS DISTINTOS AUTORES

Autor/año (cita)	Núm. de pacientes	País	Muestras	% positividad
Chang/1994 (9)	27 SK-SIDA	EE. UU. (New York)	Congeladas	93
Su/1995 (25)	4 SK-SIDA 3 SK clásico	Taiwán	?	100 66
Huang/1995 (10)	12 SK-SIDA 8 SK clásico 10 SK endémico	EE. UU. (New York)	Congeladas Parafina	100 87,5 70
Dupin/1995 (26)	4 SK-SIDA 5 SK clásico	Francia	Congeladas	100
Moore/1995 (27)	11 SK-SIDA 6 SK clásico 4 SK homosexual	EE. UU. (New York)	Congeladas	95
De Lellis/1995 (28)	17 SK-SIDA 6 SK clásico 12 SK endémico	Italia	?	100
Chang/1996 (11)	24 SK-SIDA 20 SK VIHneg	Uganda	Parafina	92 85
Noel/1996 (29)	61 SK-SIDA 6 SK clásico 11 SK iatrogénico	Bélgica	Parafina	67 50 45
Buonaguro/1996 (30)	19 SK-SIDA 28 SK clásico 12 SK endémico 2 SK iatrogénico	Italia Grecia Uganda	Congelada	100 100 100 100
Luppi/1996 (31)	22 SK clásico	Italia	Parafina	68
Dictor/1996 (32)	14 SK-SIDA 63 SK clásico	EE. UU.	Parafina	100 88
Simon/1996 (33)	16 SK-SIDA 17 SK clásico	Alemania	Parafina	100 100
Lebbé/1997 (34)	21 SK clásico 3 SK endémico 3 SK iatrogénico 4 SK homosexual	Francia	Parafina Congelada	100
Este estudio	33 SK-SIDA 6 SK clásico 3 SK iatrogénico 13 SK-SIDA 2 SK clásico	España	Parafina Congelada	72,7 100 33 92 100

SK: sarcoma de Kaposi. SIDA: síndrome de la inmunodeficiencia adquirida. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

EE. UU. De todos ellos, el que mayor número de pacientes incluyó fue el realizado en Bélgica por Noel y cols. (61 casos de SK-SIDA, seis de SK clásicos y 11 SK iatrogénicos). En este estudio se emplean muestras incluidas en parafina, y la positividad obtenida es mucho menor que la del resto de los estudios, sobre todo en los casos de SK iatrogénico, entre los que tan sólo se obtuvo un 45% de positividad (29). Sin embargo, en el estudio realizado por del Buonaguro y cols. en Italia, con muestras congeladas, la positividad fue del 100% (30). Algunos de los trabajos han incluido pacientes de Uganda (como el segundo realizado por Chang en 1996) y han confirmado la detección de ADN del VHH-8 en

los casos de SK africano, tanto en su forma endémica como en el asociado a VIH (11). Estos estudios confirman que el VHH-8 se encuentra en todas las formas clínicas de SK y en las distintas áreas geográficas.

En la tabla IV podemos observar cómo los diversos estudios realizados muestran pequeñas diferencias en cuanto al porcentaje de positividad. Las diferencias de positividad entre los distintos estudios podrían ser explicadas por:

- Ausencia del virus en algunas muestras o su presencia en un número muy bajo de copias, que no pueda ser detectado ni por la PCR (a pesar de la gran sensibilidad de esta técnica).

- Variación geográfica en cuanto a la prevalencia de la infección por VHH-8 (Luppi y cols.) (31).
- Diferencias en cuanto al tipo de muestra (fresca congelada o incluida en parafina).
- Razones técnicas, como podría ser una variación en la secuencia del genoma vírico, que hiciese imposible su detección con el par de primers utilizado. Esto ha sido demostrado por O'Neill y cols., que observan un polimorfismo en cuanto a la secuencia de nucleótidos del genoma vírico de cuatro casos que estudian; estas diferencias podrían afectar a la eficacia de la PCR (35).

En cuanto al análisis de las pieles sanas o afectas por una patología distinta del SK de los pacientes afectados por SK, en nuestro estudio se obtuvieron distintos resultados según las piezas fuesen congeladas o incluidas en parafina. De las muestras congeladas, un 37,5% fueron positivas, mientras que todas las muestras incluidas en parafina fueron negativas. Esta diferencia puede ser debida a que la mayoría de las muestras congeladas fueron obtenidas de área perilesional y por tanto susceptible de padecer SK en escaso período de tiempo, mientras que las muestras incluidas en parafina eran de piel distante.

En la **tabla V** se recogen los resultados obtenidos por distintos autores sobre la detección de ADN del VHH-8 en la piel sana de pacientes afectados por SK. Comparando los resultados de nuestro trabajo con los de otros estudios podemos observar cómo existen resultados muy dispares, así en el estudio realizado por Noel y cols. con 19 muestras; sólo hubo positividad en el 10,5% de ellas (29), mientras que en otro que incluyó seis pacientes el porcentaje de positividad ascendió a un 83% (26). Ningún autor ha sido capaz de dar una explicación clara de por qué existen tantas diferencias entre los distintos trabajos. Quizá sea debi-

do a que los autores que obtienen mayor positividad utilicen muestras de piel sana perilesional, mientras que en los trabajos que se obtiene escasa positividad las biopsias han sido obtenidas de un área distante a la afecta por el SK. Sin embargo, en el último trabajo publicado al respecto (Lebbé y cols.) se incluyen 21 muestras de piel sana distante al SK y en un 70% de ellas se obtuvo un resultado positivo. Estos autores piensan que las discrepancias no son debidas a diferencias en cuanto a la localización de la toma de la muestra, sino a las existentes en la realización del test, ya que es necesario analizar grandes cantidades de ADN para aumentar la eficacia del test cuando se analizan las pieles sanas de pacientes afectados.

En nuestro trabajo también se estudió la presencia de genoma vírico del VHH-8 en otro tipo de tumores vasculares como el angiosarcoma (seis casos), y en ninguno de los casos la detección fue positiva. Entre todos los autores se han estudiado 79 casos de angiosarcoma (36, 37), y tan sólo dos han sido positivos para el VHH-8 (Gyulai y cols. y Koizumi y cols.) (22, 38). Jin y cols. realizan un estudio amplio en el que se analiza la presencia de genoma de este virus en distintos tipos de lesiones vasculares, incluyendo: 17 SK, 15 casos de angiosarcoma, 75 de hemangioma, 25 de granuloma piogénico, 15 de linfangioma, tres de hemangiopericitoma y dos de enfermedad de Kimura; sólo se detecta ADN del VHH-8 en los casos de SK, llegando a la conclusión de que la detección de ADN del VHH-8 en una lesión vascular podría servir de marcador diagnóstico de SK (39). Dictor y cols. (32) y Maiorana y cols. (40) publican sendos trabajos, en el que se incluyen numerosas biopsias de lesiones vasculares simuladoras de SK y en ningún caso detectan secuencias víricas del VHH-8. Por ello la detección de ADN del VHH-8 sería un test útil en aquellos tumores vasculares cuyo diagnóstico no estuviese claro desde el punto de vista clínico e histológico. A este respecto consideramos muy interesante nuestro caso 19, cuyo diagnóstico clínico e histológico ofrecía dudas entre un SK y una angiomatosis bacilar y la detección de secuencias víricas del VHH-8, así como su falta de respuesta al tratamiento antibiótico nos hizo llegar a la conclusión de que se trataba de un SK.

En nuestro trabajo también se estudió la presencia de VHH-8 en tumores cutáneos no SK de pacientes VIH positivos (seis carcinomas epidermoides, dos linfomas, un carcinoma basocelular, una queratosis actínica y una dermatofibroma). Tan sólo el dermatofibroma resultó ser positivo; en ninguno de los otros 10 casos se detectó genoma vírico del VHH-8. Estos mismos resultados son los obtenidos por otros autores, en concreto Noel y cols. realizan un estudio similar, pero con 13 tumores cutáneos de pacientes con SIDA, y en ninguna de las muestras detectaron ADN del VHH-8 (29).

También se determinó la presencia de genoma vírico del VHH-8 en 10 tumores cutáneos no SK de pacientes trasplantados renales, ya que en un estudio

TABLA V: DETECCIÓN DE ADN DEL VHH-8 EN BIOPSIAS DE PIEL SANA DE PACIENTES CON SARCOMA DE KAPOSÍ. RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS DISTINTOS AUTORES

Autor/año (cita)	Núm. de pacientes	País	% positividad
Chang/1994(9)	4	EE. UU.	50
Dupin/1995 (26)	6	Francia	83
Moore/1995 (27)	14	EE. UU.	21,5
Noel/1996 (29)	19	Bélgica	10,5
Buonaguro/1996 (30)	13	Italia	69
Simon/1996 (33)	3	Alemania	0
Lebbé/1997 (34)	21	Francia	70
Este estudio:			
— Congelada	8	España	37,5
— Parafina	14		0

previo realizado por Rady y cols. se demostró la presencia de secuencias de ADN del VHH-8 en el 82% de las muestras (20). En nuestro trabajo la detección fue negativa en todos los casos. Asimismo, Dictor y cols. analizan la presencia de ADN del VHH-8 en 20 lesiones tumorales cutáneas de pacientes trasplantados renales, siendo la detección en todos ellos negativa (32). Lebbé y cols. estudian 20 lesiones tumorales epiteliales de 17 pacientes inmunodeprimidos por un trasplante, y en ninguna de ellas detectan secuencias víricas del VHH-8 (41). Dupin y cols. obtuvieron idénticos resultados (42). Pero para terminar de sembrar dudas sobre el tema, recientemente Inagi y cols. obtienen resultados similares a los de Rady y cols. y obtiene una positividad del 71% para la enfermedad de Bowen y del 50% para el carcinoma epidermoide (43). Con estos resultados los autores sugieren que existe una relación entre el VHH-8 y la proliferación de células epiteliales, y que se necesitan nuevos estudios que permitan aclarar el tema.

Nuestros resultados contradicen a los obtenidos por Rady e Inagi y cols. y son similares a los del resto de los autores. Pensamos que el VHH-8 no es un virus ubicuo que se pueda detectar fácilmente en la piel de pacientes inmunodeprimidos, sino que está relacionado e intervendría en la etiopatogenia de determinadas patologías bien definidas, y no presenta ningún papel etiopatogénico en el desarrollo de tumores cutáneos no SK, sean los pacientes inmunocompetentes o inmunodeprimidos. Las discrepancias entre los trabajos podrían ser debidas a problemas técnicos, como contaminación de las muestras en el laboratorio.

Nuestro trabajo, al igual que los demás publicados hasta la fecha, demuestra claramente una asociación entre el VHH-8 y el SK, pero demostrar que esa asociación es causal es mucho más complicado. Aun así hay varios datos que hablan a favor de que esa asociación sea causal, como el valor tan alto obtenido al calcular la odds ratio; el que un virus sea el agente etiológico del SK es plausible biológicamente, y los resultados de nuestro trabajo son consistentes con los de otros estudios ya publicados. Sin embargo, al ser nuestro trabajo un estudio transversal, fue imposible evaluar la relación temporal existente entre el VHH-8 y el SK; el virus debería ser detectado antes del desarrollo de la enfermedad para poder establecer una relación causal. Pero esta relación temporal sí que ha sido demostrada por otros autores, como Whitby y cols. en estudios sobre la detección de ADN del VHH-8 en células mononucleares de sangre periférica, demostrando que una detección positiva predice la aparición posterior de SK (13), y Gao y cols. con los estudios serológicos sobre el VHH-8 que ha realizado, detectando anticuerpos frente a antígenos del virus previo al desarrollo de SK. Por todo ello pensamos que el VHH-8 desempeña claramente un papel causal en el desarrollo de las lesiones de SK.

Abstract.—In 1994 Chang et al discovered the presence of DNA of a new type of herpesvirus (HHV-8, SKHV) in Kaposi's sarcoma (KS); since then, numerous studies have confirmed these results detecting the virus in all the clinical variants of KS. The aim of our study was to determine if there was also an association between HHV-8 and KS in our population.

Material and methods: The presence of DNA of HHV-8 in skin biopsies of 57 cases of KS (46 AIDS-KS, 9 classic KS and 3 iatrogenic KS) was studied by PCR. The following controls were also included in this study: 22 samples of healthy skin of KS patients, 11 non-KS skin tumors from HIV patients, 10 skin tumors from transplanted patients, 6 angiosarcomas and 10 biopsy specimens of healthy skin from normal adults.

Results: Sequences of DNA of HHV-8 were detected in 45/57 cases of KS (36/46 AIDS-KS, 8/8 classic KS, 1/3 iatrogenic KS). The detection was also positive in 3/22 biopsies of healthy skin in patients affected by KS, as well as in a dermatofibroma from one patient with AIDS. All the other samples were negative.

Conclusions: The association, previously described, between HHV-8 and KS also exists in the studied population (an area of Valencia, Spain). The detection of DNA of HHV-8 is specific of KS. We believe that HHV-8 is an important factor in the pathogenesis of KS.

Gil Mateo M^aP, Febrer Bosch I, Ledesma E, Aliaga Boniche A. Implication of human herpes virus 8 in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. Actas Dermosifiliograf 1999;90:489-498.

Key words: Kaposi's sarcoma. Human herpes virus 8. Angiosarcoma. Epithelial cutaneous tumors.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kaposi M. Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. *Arch Dermatol Syphil* 1872;4:265-73.
2. Centers for disease control. Follow-up on Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia*. *MMWR* 1981;45:1472-9.
3. Beral V, Peterman TA, Berkelman RL y cols. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 1990;335:123-8.
4. Grody WW, Lewin KJ, Naeim F. Detection of cytomegalovirus DNA in classic and epidemic Kaposi's sarcoma by in situ hybridation. *Hum Pathol* 1988;19:524-8.
5. Huang YQ, Li JJ, Rush MG, y cols. HPV-16 related DNA sequences in Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1992;339:515-8.
6. Kempf W, Adams V, Pfaltz M, y cols. Human herpesvirus type 6 and cytomegalovirus in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: no evidence for an etiological association. *Human Pathology* 1995;26:914-9.
7. Yuang-Hu Wang R, Wai-Kuo Shih J, Weiss SH, y cols. Myco-

- plasma penetrans infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis* 1993;17:724-9.
8. Monini P, Rotola A, De Lellis L, y cols. Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma. *Br J Cancer* 1996;66:717-22.
 9. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, y cols. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865-9.
 10. Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, y cols. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;345:759-61.
 11. Chang Y, Ziegler J, Wabinga H, y cols. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Kaposi's sarcoma in África. *Arch Intern Med* 1996;156:202-4.
 12. Rady PL, Hodak E, Yen A, y cols. Detection of human herpesvirus-8 DNA in Kaposi's sarcomas from iatrogenically immunosuppressed patients. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:429-37.
 13. Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, y cols. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;346:799-802.
 14. Howard M, Brink N, Miller R, Tedder R. Association of human herpes virus with pulmonary Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;346:712.
 15. Ambroziak JA, Blackburn DJ, Herndier BG, y cols. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* 1995;268:582-3.
 16. Shingadia D, Howard MR, Brink NS, y cols. Kaposi's sarcoma and KSHV. *Lancet* 1995;346:1359-60.
 17. Lin JCH, Lin SCH, Mar ECH, y cols. Is Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus detectable in semen of HIV-infected homosexual men? *Lancet* 1995;346:1601-2.
 18. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Eng J Med* 1995;332:1186-91.
 19. Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, y cols. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease. *Blood* 1995;86:1276-80.
 20. Rady PL, Yen A, Rollefson JL, y cols. Herpesvirus-like DNA sequences in non-Kaposi's sarcoma skin lesions of transplant patients. *Lancet* 1995;345:1339-40.
 21. Sander CA, Simon M, Puchta U, Raffeld M, Kind P. HHV-8 in lymphoproliferative lesions in skin. *Lancet* 1996;348:475-6.
 22. Gyulai R, Kemény L, Kiss M, Adam E, Nagy F, Dobozy A. Herpesvirus-like DNA sequence in angiosarcoma in a patient without HIV infection. *N Eng J Med* 1996;334:540-1.
 23. Gyulai R, Kemény L, Adam E y cols. HHV-8 in angiolymphoid hyperplasia of the skin. *Lancet* 1996;347:1837.
 24. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols. Aguide to methods and applications*. Harcourt Brace Jovanovich Publisher; 1990;153-8.
 25. Su JJ, Hsu YS, Chang YCH, Wang IW. Herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma from AIDS and non-AIDS patients in Taiwan. *Lancet* 1995;345:722-3.
 26. Dupin N, Grandadam M, Calvez V, y cols. Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;345:761-2.
 27. Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N Eng J Med* 1995;332:1181-5.
 28. De Lellis L, Fabris M, Cassai E, y cols. herpesvirus-like DNA sequences in non-AIDS Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 1995;172:1605-7.
 29. Noel JC, Hermans P, Andre J, y cols. Herpesvirus-like DNA sequences and kaposi's sarcoma. Relationship with epidemiology, clinical spectrum, and histologic features. *Cancer* 1996;77:2132-6.
 30. Buonaguro FM, Tornesello ML, Beth Giraldo E, y cols. Herpesvirus-like DNA sequences detected in endemic, classic, iatrogenic and epidemic Kaposi's sarcoma (KS) biopsies. *Int J Cancer* 1996;65:25-8.
 31. Luppi M, Barozzi P, Maiorana A y cols. Frequency and distribution of herpesvirus-like DNA sequences (KSHV) in different stages of classic Kaposi's sarcoma and in normal tissues from an Italian population. *Int J Cancer* 1996;66:427-31.
 32. Dictor M, Rambech E, Way D, Witte M, Bendsoe N. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus) DNA in Kaposi's sarcoma lesions, AIDS Kaposi's sarcoma cell lines, endothelial kaposi's sarcoma simulators, and the skin of immunosuppressed patients. *Am J Pathol* 1996;148:2009-16.
 33. Simon M, Kind P, Kaudewitz P, y cols. Detection of herpesvirus-like DNA in HIV-associated and classical Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol Res* 1996;288:402-4.
 34. Lebbé C, Agbalika F, De Cremoux P, y cols. Detection of human herpesvirus 8 and human T-cell lymphotropic virus type 1 sequences in Kaposi sarcoma. *Arch Dermatol* 1997;133:25-30.
 35. O'Neill E, Henson TH, Ghorbani AJ, Land MA, Webber BL, García JV. Herpes virus-like sequences are specifically found in Kaposi sarcoma lesions. *J Clin Pathol* 1996;49:306-8.
 36. Tomita Y, Naka N, Aozasa K, Cesarman E, Knowles DM. Absence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences (KSHV) in angiosarcomas developing in body-cavity and other sites. *Int J Cancer* 1996;66:141-2.
 37. Takata M, Hatta N, Takehara K, Fujiwara H. Absence of human herpesvirus-8 DNA in angiosarcomas and other skin tumors in immunocompetent patients, and in graft-versus-host disease in the immunosuppressed recipients of bone marrow transplants. *Br J Dermatol* 1997;137:156-7.
 38. Koizumi H, Ohkawara A, Itakura O, Kikuta H. Herpesvirus-like DNA sequences in classic Kaposi's sarcoma and angiosarcoma in Japan. *Br J Dermatol* 1996;135:1009-10.
 39. Jin YT, Tsai ST, Yan JJ, Hsiao JH, Lee YY, Su IJ. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequence in vascular lesions. A reliable diagnostic marker for Kaposi's sarcoma.
 40. Maiorana A, Luppi M, Barozzi P, Collina G, Fano RA, Torelli G. Detection of human herpes virus type 8 DNA sequences as a valuable aid in the differential diagnosis of Kaposi's sarcoma. *Mod Pthol* 1997;10:182-7.
 41. Lebbé C, Tatoud R, Morel P, y cols. Human herpesvirus 8 sequences are not detected in epithelial tumors from patients receiving transplants. *Arch Dermatol* 1997;133:111.
 42. Dupin N, Gorin I, Escande JP, y cols. Lack of evidence of any association between human herpesvirus 8 and various skin tumors from both immunocompetent and immunosuppressed patients. *Arch Dermatol* 1997;133:537.
 43. Inagi R, Kosuge H, Nishimoto S, Yoshikawa K, Yamanishi K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) sequences in premalignant and malignant skin tumors. *Arch Virol*