

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

10  
2es

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN EL SARCOMA DE  
KAPOSI ASOCIADO A SIDA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN INVESTIGACION  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A :  
Q.F.B. CLAUDIA GOMEZ PALOMINO

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

266342



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos UNAM-SSA, bajo la asesoría del Dr. Lino Díaz de León Hernández, de la M. en C. Carmen Soler Claudín y la Q.F.B. María del Carmen Basualdo Sigales.*

*En el Instituto Nacional de Cancerología bajo la asesoría del Dr. Gerardo Sánchez Mejorada, la Dra. Jeannette Guarner Lans, el Dr. Guillermo Flores Flores y la Q.F.B. Patricia Montoya Pérez.*

*En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán bajo la asesoría del M. en C. Beuito López Baños.*

*A todos gracias.*

*Agradezco a la compañía ASPID S.A. de C.V. por el apoyo  
otorgado para la realización de esta tesis*

*En memoria de todos aquellos que se han infectado con el VIH y en especial a Francisco, Francisco Javier y Rubén, que siempre tuvieron la disposición de participar en este estudio y el optimismo de luchar, con la esperanza de que en cualquier momento alguien encontrara la cura de esta enfermedad antes de su fallecimiento.*

*“Conocer la complejidad de los mecanismos de patogenicidad del VIH, es comprender que la solución está en la simplicidad de prevención de la infección”*

*Claudia Gómez*

*A mi hija Claudia Elena y a su papá*

*A mis padres, abuela y hermanas*

*A mis amigos Ana Laura, Fernanda, Amine y José*

*A todos los que han compartido los momentos buenos  
y malos durante el proceso de mi formación*

## **CONTENIDO**

### **RESUMEN**

### **LISTA DE ABREVIATURAS LISTA DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. HIPOTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>IV. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>VI. DISCUSION .....</b>	<b>38</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>48</b>

## RESUMEN.

El Fibroquel<sup>MR</sup> es un fármaco con propiedades antifibrogénicas debidas a su capacidad de modificar algunas de las citocinas fibrogénicas y proinflamatorias, como son: TGFβ1 y PDGF, y las moléculas de adhesión ELAM-1 y VCAM-1, que participan en la regulación del crecimiento, diferenciación, adhesión e inmunorregulación.

En el sarcoma de kaposi (sk), las células en huso, características de la neoplasia, producen y responden a una gran variedad de citocinas tales como la IL-1, IL-2, IL-8, IL-6, TGFβ1 y PDGF, entre otras, por lo cual se deriva el interés de evaluar el efecto de Fibroquel<sup>MR</sup>, tanto *in vitro* como *in vivo*, en esta patología. En el estudio *in vivo*, se incluyeron 3 controles sanos y 3 pacientes con sk asociado a SIDA, a quienes se les realizó la determinación de anticuerpos anti-VIH. El Fibroquel<sup>MR</sup> se aplicó en una dosis de 0.2 ml vía intralesional cada 3 días durante 2 meses. En los pacientes se aplicó en una lesión de sk y en los controles sanos en una área de piel seleccionada por ellos mismos. Previo a la aplicación de Fibroquel<sup>MR</sup>, en los pacientes, se tomó biopsia antes del tratamiento y posteriormente al mes de éste. Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes y controles al tiempo cero y cada mes durante tres meses. Se realizaron los siguientes estudios: biometría hemática, química sanguínea y evaluación de la expresión de receptores de superficie celular: CD4, CD8, CD16, CD19, CD14 y HLA-DR. A los pacientes también se les determinó, Ag p24 y se realizó aislamiento del VIH a partir de sus células mononucleares periféricas.

Entre los resultados obtenidos se encontró que el Fibroquel<sup>MR</sup> modificó significativamente los niveles de CD14 y no modificó los niveles de Ag p24 en los pacientes con SIDA. En las biopsias de los pacientes, después del tratamiento con el fármaco, se observó disminución de las estructuras vasculares, mientras que clínicamente se observó cambio de coloración de la lesión y descamación de la misma.

En estudios *in vitro* primero se determinó la toxicidad del Fibroquel<sup>MR</sup> en las líneas celulares Hut 78, HeLA-CD4+ y KS4. Posteriormente se determinó la capacidad de inhibir la replicación viral en la línea Hut 78 infectada, encontrando que el Fibroquel<sup>MR</sup> no tiene la capacidad de inhibir la replicación viral en esta línea. La toxicidad en la línea KS4 fué 50% mayor que en las líneas HeLA-CD4+, y Hut 78. Estos resultados sugieren que las modificaciones inducidas por el Fibroquel<sup>MR</sup> podrían deberse al efecto sinérgico de la toxicidad y la alteración en la producción de citocinas en las células fusiformes y en los macrófagos y fibroblastos que están infiltrados en la lesión y no a una inhibición de la replicación viral.



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha 5\beta 1$	Receptor de fibronectina
$\alpha v\beta 3$	Receptor de vitronectina
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ag p24	Proteína de la cápside del virus de la inmunodeficiencia humana
BC-1	Línea celular que contiene genoma del virus herpes tipo 8
CD14	Receptor de las células monocíticas
CD16/CD56	Receptores de las células asesinas
CD19	Receptor de los linfocitos B
CD4	Receptor de los linfocitos T ayudadores
CD8	Receptor de los linfocitos T citotóxicos
Células sk	Células en forma de huso características de la lesión de sarcoma de kaposi
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
EBV	Virus de Epstein Barr
EDTA	Acido etilendiaminotetra acético
ELAM -1	E- Selectina
F25	Frascos de cultivo celular de 25 cm <sup>2</sup>
F75	Frascos de cultivo celular de 75 cm <sup>2</sup>
FGFb	Factor de crecimiento básico de los fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y fibroblastos
H&E	Hematoxilina y eosina
HHV-8	Virus herpes humano tipo 8
HLA-DR	Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II
HTLV-II	Virus de la leucemia de células T humanas tipo II
Hut-78	Línea celular linfocitaria
IIIb	Virus prototipo de la inmunodeficiencia humana
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF $\alpha$	Interferón alfa

Kb	Kilopares de bases
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato diácido de potasio
KS4	Línea celular de sarcoma de kaposi
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LN	Linfocitos normales no infectados
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Fosfato ácido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
OSM	Oncostatina-M
p53	Gen relacionado con los procesos apoptóticos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF-A	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas tipo A
PDGF-B	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas tipo B
PE	Ficoeritrina
Psk	Paciente con sarcoma de kaposi
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RPMI	Medio de cultivo celular
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
sk	Sarcoma de kaposi
tat	Proteína transactivadora del virus de la inmunodeficiencia humana
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular tipo 1
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
v-IL-6	Variante de la interleucina 6

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>FIGURA 1. TOXICIDAD DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN LINEAS CELULARES.....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 2. RELACION DE ANTIGENO p24/NUMERO DE CELULAS AL TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 3. PATRON DE WESTERN BLOT Y RESULTADOS DE SERODIA DE LOS PACIENTES CON SK TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>26</b>
<b>TABLA 1. EXPRESION DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR DE LOS PACIENTES CON SK Y DE LOS CONTROLES SANOS TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>28</b>
<b>TABLA 2. RESULTADOS DE LA QUIMICA SANGUINEA DE LOS PACIENTES CON SK Y DE LOS CONTROLES SANOS TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>29</b>
<b>TABLA 3. RESULTADOS DE LA BIOMETRIA HEMATICA DE LOS PACIENTES CON SK Y DE LOS CONTROLES SANOS TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 4. LESION DE SARCOMA DE KAPOSÍ AL INICIO DEL TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 5. LESION DE SARCOMA DE KAPOSÍ AL MES DE TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 6. LESION DE SARCOMA DE KAPOSÍ AL INICIO DEL TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 7. LESION DE SARCOMA DE KAPOSÍ AL MES DE TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.....</b>	<b>32</b>
<b>FIGURA 8. CRECIMIENTO NODULAR DE SARCOMA DE KAPOSÍ CON VASOS MORFOLOGICAMENTE SIMILARES A CAPILARES, EN LA PARTE SUPERIOR DERECHA SE OBSERVA "PENACHO" PERIVASCULAR CARACTERISTICO DE PROLIFERACION DE KAPOSÍ (PRETRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>).....</b>	<b>34</b>
<b>FIGURA 9. "GRIETAS Y HENDIDURAS VASCULARES CON ESPACIOS CLAROS DE CELULAS ENDOTELIALES NEOPLASICAS (PRETRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>).....</b>	<b>34</b>

<b>FIGURA 10. SARCOMA DE KAPOSI GRADO II COMBINACION DE ESTRUCTURAS VASCULARES SEMEJANDO TEJIDO DE GRANULACION CON HENDIDURAS VASCULARES EN UN PATRON DE CRECIMIENTO NODULAR DENSO (PRETRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>)</b> .....	35
<b>FIGURA 11. CANALES VASCULARES CRECIENDO ALREDEDOR DE LOS ANEXOS QUE CONSERVAN LA MORFOLOGIA CARACTERISTICA SE OBSERVA PATRON VASCULAR PROMINENTE (PRETRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>)</b> .....	35
<b>FIGURA 12. IMAGEN A MAYOR AUMENTO DE LA FIGURA 11 CON ESPACIOS VASCULARES PERIANEXIALES CLARAMENTE VISIBLES (PRETRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>)</b> .....	36
<b>FIGURA 13. SARCOMA DE KAPOSI POST-TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup> SE OBSERVA UN ESTROMA EDEMATOSO LAXO, CON ESCASAS ESTRUCTURAS VASCULARES</b> .....	36
<b>FIGURA 14. ESTROMA EDEMATOSO LAXO DE SARCOMA DE KAPOSI POST-TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup> CON ESCASA DENSIDAD VASCULAR Y VASOS DEL TAMAÑO DE CAPILARES</b> .....	37
<b>FIGURA 15. SARCOMA DE KAPOSI POST-TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup> SE OBSERVA UN ESTROMA EDEMATOSO LAXO CON ESCASAS ESTRUCTURAS VASCULARES</b> .....	37
<b>FIGURA 16. VARIACION DEL % DE CD8 EN LOS CONTROLES Y EN LOS PACIENTES TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup></b> .....	40
<b>FIGURA 17. VARIACION DEL % DE CD14 EN LOS CONTROLES Y EN LOS PACIENTES TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup></b> .....	41
<b>FIGURA 18. PORCENTAJE DE CD4 EN LOS CONTROLES Y PACIENTES TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup></b> .....	43
<b>FIGURA 19. PORCENTAJE DE CD19 EN LOS CONTROLES Y PACIENTES TRATADOS CON FIBROQUEL<sup>MR</sup></b> .....	44

## I. INTRODUCCION.

### ***EL SARCOMA DE KAPOSÍ.***

El sarcoma de kaposi (sk) fue descrito por primera vez por el dermatólogo húngaro Moritz Kaposi y se define como una condición tumoral caracterizada por la proliferación de una mezcla de células en forma de huso que están mezcladas con células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y estructuras vasculares. La proliferación de estas células ocurre típicamente en múltiples sitios, más frecuentemente en la dermis y resulta en la producción de nódulos o placas con apariencia violácea, que involucra la piel y se asocia con edema (Gill, P.S., 1991; Safai, B., et. al., 1985).

El sk puede presentarse como: **1) enfermedad nodular:** manifestandose como un nódulo, placa o ambas, usualmente en el tejido subcutáneo de un miembro inferior. Inicia con una lesión que se extiende al resto del cuerpo. En la enfermedad nodular (patrón clásico), el primer signo es usualmente un cambio de coloración de la piel. Esto toma la apariencia de un nódulo violáceo con un halo algunas veces de color café o amarillo. La mayoría de los nódulos se localizan inmediatamente debajo de la epidermis. El edema puede anteceder al desarrollo de los nódulos, que generalmente son de 1.5 cm o más pequeños. El dolor espontáneo es inusual y algunos pacientes reportan sensación de comezón o ardor.

Cuando la enfermedad se manifiesta como una placa, el tumor se extiende lateralmente a lo largo de la dermis en el nivel de las glándulas sudoríparas y produce induración de la piel sobre largas áreas completas. La placa es una combinación del tejido tumoral con induración de la piel que lo rodea, resultando una obstrucción linfática; **2) enfermedad agresiva:** se puede presentar "de novo" o puede presentarse en pacientes con lesiones nodulares a partir de la dermis. Estas lesiones frecuentemente se ulceran y pueden crecer extremadamente rápido e invadir el tejido plano e involucrar hueso. Las lesiones son usualmente solitarias y aparecen lobuladas; **3) enfermedad generalizada:** se presentan lesiones cutáneas mínimas, y en casi todos los órganos del cuerpo.

Mediante el análisis histopatológico de las lesiones de sk pueden ser reconocidos principalmente 2 elementos: las células en huso y el componente vascular. Las células en huso son muy similares a los fibroblastos. El núcleo está localizado en el centro y se encuentra elongado. Se observa la presencia de reticulina y la colágena es poco prominente en el núcleo.

Se ubican en la periferia del nódulo, vasos endoteliales maduros alineados y son de 2 tipos: sanguíneos y linfáticos. Existen espacios que ocupan una larga proporción del tumor con sólo una mínima cantidad de tejido. Se encuentran células rojas en los espacios vasculares y entre las células en huso. Una de las características de este tumor es la posición directa de las células en huso sobre los eritrocitos sin intervención del endotelio. Usualmente se encuentran células inflamatorias como son: linfocitos y macrófagos. Estas células inflamatorias pueden localizarse alrededor de los nódulos en regresión y en tumores agresivos algunas veces se ven muchas células plasmáticas. La presencia de un pigmento de hierro llamado hemosiderina es usualmente mencionado en la descripción de esta enfermedad (Templeton, A.C., 1991.).

### ***EPIDEMIOLOGIA E INCIDENCIA DEL SK.***

En la mayor parte del mundo el sk es una enfermedad rara siendo mucho más común en el este de Europa y Africa tropical. Algunos grupos raciales de: Suecia, Iraq, India, Ceylan, Afganistán, Nueva Guinea, China, Japón y Sur de América son también afectados. El mayor número de casos se han presentado en Africa, principalmente en el área del Congo. Es bien conocido que los estados de inmunodeficiencia, están asociados con una alta incidencia de sk y se sabe que en el 2 % de los casos, puede ocurrir la regresión espontánea de todas las lesiones resultando en la aparente cura del sk (Templeton, A.C., 1991).

El sk esta frecuentemente asociado con la evolución de la infección con VIH (Gill, P.S., 1991). Inicialmente apareció en el 40 al 45 % de los pacientes con SIDA, su incidencia ha disminuido a 10% entre todos los grupos de riesgo y al 18% en hombres homosexuales; sin embargo, en los pacientes con SIDA es la más frecuente de las neoplasias, con una incidencia del 7.7%, mientras que el conjunto de las otras neoplasias se presenta sólo en el 2.8 % de los pacientes (SIDA/ETS, 1992).

Las variaciones en la incidencia del sk han inducido a cuestionamientos referidos a su etiología y patogénesis. La dificultad para cultivar las células de sk, la naturaleza crítica de los factores de crecimiento y la influencia de las proteínas del VIH sobre el desarrollo del sk, han afectado substancialmente la comprensión de la etiología y la patogénesis del sk. Hasta el momento el tratamiento del sk está basado en los requerimientos para controlar las complicaciones viscerales, edema o lesiones cosméticamente intolerables.

## **ETIOPATOGENIA DEL SK.**

Hasta la fecha se desconoce la etiología del sk, sin embargo, existen diferentes hipótesis que han sido planteadas basándose en diversas características de esta patología como son: la variación geográfica y racial, la proporción sexual (3 hombres por cada mujer en niños y en adultos 15 hombres por cada mujer), la apariencia histológica de células en forma de huso y del tejido vascular, la coincidencia con la aparición de linfoma maligno, su asociación con edema localizado que puede preceder al sk, su tendencia a aparecer al inicio en las extremidades (pies, manos, nariz, orejas, pene), y la aparición de las lesiones en regiones traumatizadas (Templeton, A.C., 1991.).

Los factores etiológicos son muchos y muy variados, por ejemplo, se ha mencionado el frío (ya que la enfermedad es más común en áreas ecuatoriales), la edad, el estado hormonal y factores genéticos, la proteína tat del VIH, la secuencia del HHV-8 y la producción de citocinas por los diferentes tipos celulares que se encuentran constituyendo la lesión (Templeton, A.C., 1991).

## **CELULAS SK.**

Por sus características en cultivo las células en forma de huso o fusiformes (células sk) se asemejan a las células endoteliales y las de músculo liso. Se piensa que estas células son la representación de una célula parenquimatosa primitiva, que posee receptores para una amplia gama de citocinas, lo cuál les permite una rápida proliferación y el desarrollo rápido de nuevos vasos sanguíneos, siendo así la angiogénesis una característica principal de la lesión. Esto ha sido comprobado por los modelos desarrollados en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo y el modelo de los ratones desnudos inoculados con células sk, que desarrollan lesiones características similares al sk con proliferación de células fusiformes, leucocitos, fibroblastos y edema. Las tinciones inmunohistoquímicas de células de sk aisladas, muestran que fueron derivadas del tejido mesenquimal con características de células de músculo y endoteliales. La reacción positiva al antígeno relacionado al factor VIII en el citoplasma de las células en huso indica que éstas son de origen endotelial ya que este factor sólo es sintetizado por megacariocitos y células endoteliales (Nadji, M., et. al., 1981).

Las células sk se pueden cultivar con medios condicionados de líneas de células T inmortalizadas por el retrovirus HTLV-II (virus de la leucemia de células T humanas). Los factores conocidos de estos medios condicionados promueven el crecimiento de las células sk y también de células endoteliales. Esto sugiere que las células sk y las células T infectadas con retrovirus, producen factores angiogénicos que podrían incrementar el crecimiento de las células sk. La reacción angioblástica observada en el sitio de inoculación de células sk en ratones desnudos confirma que las células sk producen sustancias que son angiogénicas.

Gallo y col. demostraron que las células sk, procedentes de biopsias de sk asociado a SIDA, podían incrementar su crecimiento, *in vitro*, en presencia de oncostatina M (OSM), glicoproteína que inhibe el crecimiento de varias células cancerosas y es un potente mitógeno para las células sk, induce la producción de IL-6 en las mismas y es liberada por células T infectadas por el retrovirus HTLV-II. La OSM es el principal factor de crecimiento presente en estos medios condicionados y podría ser un agente transformante, ya que altera las características histológicas de las células sk en cultivo y sostiene el crecimiento de éstas (Travis, N. 1992; Nair, B., et. al., 1992). Además, Sarngadharan, sugirió que las células T inmortalizadas no sólo producían OSM sino una serie de sustancias que inducían a las células sk a producir citocinas y que éstas últimas, de una forma autócrina o parácrina, podrían inducir cambios histológicos característicos de las sk en el SIDA. Por otra parte, Miles y Linsley consideraron que la IL-6 era el factor que hacía proliferar a las sk, sin embargo, Gallo y Miles llegaron a la conclusión de que la IL-6 no es el factor fundamental, ya que aunque ésta aumenta la proliferación de las sk, no lo hace de manera sistemática (Miles, S., et. al., 1992), aunque los receptores de la OSM son iguales a los de factor inhibidor de la leucemia (LIF) y a los de la IL-6 (Gearing, D.P., et. al., 1992).

### **CITOCINAS EN EL SK.**

Ya que el sk puede aparecer en individuos infectados por VIH-1 antes de que existan signos de inmunodeficiencia, Barillari y col. basándose en estudios de efectos individuales con citocinas recombinantes, han sugerido que las citocinas juegan un papel importante en la patogenia del sk induciendo un estímulo del crecimiento, ya que receptores de alta afinidad para varias citocinas, incluyendo, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF y PDGF están presentes en las células sk. Por lo tanto, ya que las células sk producen y responden a varias de estas citocinas, podrían



regular su crecimiento de forma autócrina y parácrina *in vivo* e *in vitro*. (Barillari, G., et. al., 1992; Ksinkovics, J.G., 1991).

Lunardi-Iskandar y col. en 1995 describieron como la IL-1, IL-2 y el TNF actúan sobre el sk de una forma parácrina mientras que la IL-6 lo hace mediante una vía autócrina incrementándose en las células de sk mediante la acción de glucocorticoides y testosterona e inhibiéndose con 17-beta estradiol, lo cuál podría explicar la predisposición de sexos. Dado que las células sk son capaces de producir tumores malignos metastásicos que pueden ser destruidos *in vivo* e *in vitro* por la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana, se sostiene la idea de que el sk es un proceso maligno de dependencia endócrina que podría ser controlado con intervenciones endócrinas como los cánceres de mama y de próstata. Sin embargo, el riesgo de presentar sk en mujeres embarazadas, es igual al riesgo de las que no lo están, por lo cuál se deben considerar otros factores que influyan sobre la diferencia entre hombres y mujeres en cuanto a la incidencia del sk (Rabkins, Ch. S., et. al. 1995).

En resumen, las citocinas producidas por las células sk y probablemente involucradas en el control autócrino de la proliferación celular incluyen FGFb, CSF-1, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL- $\beta$ , IL-6, TGF $\beta$ , PDGF-A y PDGF-B, de las cuáles el FGFb, TNF $\alpha$  y PDGF muestran actividad angiogénica, mientras que GM-CSF, IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , TNF $\alpha$  y PDGF pueden también activar la replicación del VIH en células infectadas (Barillari, G., et. al. 1992).

El PDGF ha sido recientemente identificado como uno de los factores necesarios para permitir el crecimiento de células de sk "in vitro". De hecho la depleción de PDGF del suero inhibe el crecimiento de las células sk (Wernwr, C.G., 1990).

El TGF- $\beta$  es producido por células endoteliales y por macrófagos infiltrados en las lesiones de sk y su RNAm es expresado en las células de sk. Las actividades biológicas del TGF $\beta$  incluyen la proliferación de algunas células de tejido conjuntivo e inhibición de otras como los linfocitos, inducción de la producción de colágena y matriz extracelular, así como la expresión de moléculas de adhesión por lo que podría influir en la proliferación de las células fusiformes en el sk tal como lo hace en las fibrosis, en la formación de cicatrices queloides, en la cirrosis, en el escleroderma o en la artritis reumatoide (Ensolì, B., et.al., 1989).

## **VIRUS EN EL SK.**

La hipótesis de la etiología vírica cobra importancia cuando se considera que el sk es más prevalente entre varones homosexuales con VIH+, que entre pacientes VIH+ infectados por otras vías y que el riesgo de presentar sk en mujeres aumenta en aquellas que han tenido relaciones sexuales con hombres bisexuales por lo que en base a estas observaciones se han considerado, además del VIH-1, otros virus que podrían ser transmitidos por vía sexual (Gill, P.S., 1991).

Con respecto al VIH-1, se ha descrito que al inicio de su replicación el VIH-1 produce la proteína tat (transactivador positivo) que es liberada al medio extracelular y es capaz de inducir la proliferación de las células sk en los pacientes con SIDA y que actuando sobre las células progenitoras de las sk las convierte en células fusiformes capaces de producir citocinas y responder a las mismas originándose así la lesión de sk ( Ensoli, B., et. al., 1990).

La proteína tat y las citocinas pueden actuar sinérgicamente incrementando sus efectos celulares y virales ya que algunas citocinas estimulan la proliferación de las células sk y al mismo tiempo activan la expresión y replicación de los genes del VIH-1, interrumpiendo la latencia viral y produciendo la expresión de tat adicional. Específicamente tat potencia su acción con el FGFb, factor angiogénico altamente expresado en lesiones sk induciendo la angiogénesis y la formación de la lesión de sk. Esto es debido a que la región RGD de tat que se une a las integrinas  $\alpha\beta 1$  y  $\alpha\beta 3$  media la migración e invasión endotelial y de las células sk y provee a las células de una señal requerida para el crecimiento de las células sk en respuesta a un estímulo angiogénico. Además, la región básica de la proteína tat se une al proteoglicano heparán sulfato en la superficie de las células y en la matriz extracelular y conlleva a que una forma soluble de FGFb sea capaz de ejercer su acción, mediando el crecimiento celular. Similarmente, estas integrinas son expresadas por células endoteliales y células en huso de las lesiones de sk (Ensoli., 1996).

Aunque la proteína tat incrementa la proliferación de las células sk, ésta no afecta a las células musculares ni endoteliales en cultivo. Sin embargo, los efectos mitogénicos de tat son mínimos (menos de 2 veces) y no son de la misma magnitud que con citocinas tales como la OSM, TNF o IL-1 $\beta$ . Además, la demostración de que tat podría contribuir al desarrollo de sk es importante por varias razones. Primero se confirma que los datos en etapa temprana en que se demostró que tat, bajo el control del LTR, podría producir lesiones parecidas a sk en ratones transgénicos y segundo la demostración de que el VIH podría directamente inducir angiogénesis y ser el único factor necesario para el desarrollo del sk asociado a VIH (Vogel, J., et. al. 1988).

Ya que *tat* no parece modificar la síntesis de una amplia variedad de citocinas en las células sk es posible que la transformación y/o proliferación de las células sk dependa de los factores liberados por células que están infiltrando en la lesión, especialmente fibroblastos, macrófagos y células T (Buónaguro., et.al., 1992; Safai, B., et. al., 1985).

Por otra parte VIH no tiene secuencias oncogénicas conocidas por lo que no existen virus ni fragmentos del genoma viral en las células del sk. Esto hace pensar que la aparición de las neoplasias conocidas en este padecimiento son secundarias al abatimiento de la función del aparato inmunológico dando nuevo apoyo a la teoría de la vigilancia de Burnett. Los tumores parecen ser independientes del VIH como se ha sugerido por el hecho de que los homosexuales pueden tener un riesgo incrementado de desarrollar sk, aun si ellos no están infectados con el VIH (Gill, P.S., 1991; Safai, B., et. al., 1985).

En lo que se refiere a otros virus que podrían ser considerados en la etiología del sk Yao Qi Huang y col. han descrito la existencia de secuencias de ADN homólogas al virus del papiloma humano tipo 16 en el 15 % de las células de las lesiones sk tomadas de 69 pacientes. Este porcentaje es bajo, sin embargo, se atribuye a métodos de detección poco sensibles ya que también se ha logrado evidenciar en 5 de 17 pacientes sk negativos al VIH (Huang, Q.Y., et. al., 1993). Sin embargo, otros investigadores afirman que han buscado secuencias de papiloma en lesiones sk sin ningún éxito (Travis, J., 1992).

Así mismo, Beral pone en duda la implicación del virus papiloma ya que se trata de un virus demasiado ubicuo para estar implicado en una enfermedad tan peculiar, por lo que sugiere que es otro agente que está asociado con prácticas orofecales ya que es más frecuente en varones homosexuales, lo cuál coincide con su mayor frecuencia en Africa, donde las condiciones higiénicas adversas provocan un mayor contacto con heces (Beral, V., et. a., 1992).

Recientemente muchas de las investigaciones están siendo enfocadas en la búsqueda de un virus ahora más convincentemente aceptado como un herpes virus nuevo llamado herpes virus humano 8 (HHV-8), con homología de secuencias de ADN al Gammaherpes virus, saimiri y Epstein-Barr, esto probado en lesiones de sk de pacientes con SIDA (Chang, Y., et. al., 1994).

La detección *in situ* del HHV-8 en lesiones sk demostró que la positividad viral está siempre restringida al núcleo de las células y confinada al tejido patológico donde el 80 % de las células parecen estar infectadas con el virus. Sólo las células en huso y las células rodeando los espacios vasculares presentaban el virus mientras que los vasos sanguíneos normales intralesionales y tejido extralesional fueron negativos. Las biopsias de piel normal de los individuos con sk fueron negativas a HHV-8 (Parravivini, C., et. al., 1996). También Bagasra y col.

en 1996 demostraron que el HHV-8 está más abundantemente en las células en huso rodeando la lesiones sk, formando focos en varias capas de la dermis pero ausentes en las células granulares.

Por su parte, Whitby también ha logrado evidenciar el HHV-8 y le atribuye valor predictivo en la aparición de lesiones de sk ya que de 143 pacientes sin sk que fueron seguidos por 30 meses, 6 de 11 positivos por PCR a HHV-8 desarrollaron las lesiones, mientras que de los que fueron HHV-8 negativos lo hicieron sólo 12 de 132. (Whitby, D., et. al., 1995).

Lefrere y col. en 1996 evidenciaron el DNA de HHV-8 en PBMC y lesiones sk durante el periodo completo (6 años entre la infección primaria y la aparición de sk) 5 pacientes VIH positivos asintomáticos a los cuáles se les detectó el DNA de HHV-8 desde el inicio y desarrollaron sk. Los controles usados fueron 6 pacientes con sk en etapa de SIDA de los cuáles 5 eran HHV-8 positivos y 1 negativo; 14 pacientes con SIDA sin sk, 13 negativos y 1 positivo; y 10 VIH negativos, 9 negativos a HHV-8 y 1 positivo. Estos resultados indican que el HHV-8 puede ser evidenciado varios años antes de la aparición de la enfermedad en individuos VIH-1 infectados dando una perspectiva de terapia preventiva. La evidencia de la presencia de HHV-8 desde el primer año de seropositividad podría sugerir que los dos virus entraron juntos o que los pacientes fueran portadores HHV-8.

La búsqueda del HHV-8 también ha sido efectuada en otras formas de sk además del asociado a SIDA, el endémico africano y el esporádico y comprobándose su importancia patogénica en distintos tejidos de los pacientes con sk (piel, ganglio linfático, tejidos intestinal y oral) tanto en hombres como en mujeres y niños, y su ausencia en tejidos no relacionados con el sk, sugiriendo una vía de transmisión no sexual debido a su presencia en niños (Schalling, M., et. al., 1995). También ha sido demostrado en PBMC y lesiones de sk Mediterráneo y en la enfermedad de Castelman, una hiperplasia angiofolicular frecuentemente asociada con sk (Dupin, N., et. al., 1996).

Recientemente se ha encontrado que los fragmentos subgenómicos del HHV-8 pueden transformar las células NIH3T3 indicando que este virus es transformante. La cepa BC-1 de HHV-8 fue secuenciada recientemente y tiene una región única de 140.5 Kb (LUR) conteniendo todas las regiones codificadoras identificadas. Mientras que la mayoría de los genes son homólogos a los genes estructurales encontrados en el EBV, el HHV-8 posee un número de genes único que podría interferir con las señales de transducción y el ciclo celular de las células huésped. El virus posee una ciclina funcional del tipo D que puede sustituir a las humanas en la

inhibición del pRb y por tanto inducir a las células a la transformación celular. Este gen codifica una v-IL-6 funcional que puede prevenir la apoptosis en las líneas de células dependientes de IL-6 y es expresado preferentemente en células hematopoyéticas más que en las células de sk. Otros genes virales antiapoptóticos también podrían interferir con los mecanismos apoptóticos mediados por p53. Hay una estrecha correspondencia entre los genes celulares inducidos por EBV y los genes homólogos codificados por HHV-8. Esto sugiere que ambos virus interfieren con las mismas vías de señalización y podrían compartir mecanismos comunes de transformación celular (Patrick y Moore 1997).

Después de todo el debate continua debido a que sólo algunos grupos de investigadores han encontrado dichas secuencias mientras que otros han fracasado (Schultz, T.F., et. al., 1995; Ambrozio, K., et. al., 1995; Roizman, B., 1995; Moore, S.P., 1996).

La duda, acerca de la posible relación etiológica del HHV-8 con el sk, continua bajo los siguientes argumentos (Weiss, A., 1996; Cohen, J., 1995):

1. Si el HHV-8 fuera el agente causal del sk, sería el más heterodoxo de los virus herpes, los cuáles se caracterizan por difundirse libremente en la población, mientras que éste no afectaría más que a hombres homosexuales y sólo raramente a mujeres o usuarios de drogas por vía intravenosa.
2. No se han encontrado secuencias del HHV-8 en líneas celulares derivadas de sk de enfermos de SIDA, las cuáles eran capaces de producir lesiones similares a sk en ratones.
3. Se han encontrado secuencias de HHV-8 en distintas lesiones cutáneas tales como carcinoma basal y de células escamosas, queratosis actínica premaligna y verrugas comunes, procedentes de biopsias de cuatro transplantados VIH negativos que habían recibido terapia inmunosupresora.

Estos datos irían en contra de la noción de que HHV-8 sería específico del sk.

Así, considerando la etiología viral no se han dejado esperar los tratamientos antivirales. Humphrey y col. 1996 trataron pacientes positivos a HHV-8 con ganciclovir, aciclovir y foscarnet encontrando que ellos continuaban siendo positivos a HHV-8 durante el tratamiento e incluso uno que era negativo después se convirtió en positivo. Por lo que ellos ponen en duda el valor potencial de estas drogas en el tratamiento o prevención del sk indicando que se requieren estudios adicionales.

En resumen, evidencias experimentales sostienen que el origen del sk involucra a las citocinas y a un agente infeccioso, el HHV-8, que ha sido encontrado en casi todas las lesiones

de sk aunque no está presente en los cultivos de células en forma de uso derivadas de las lesiones de sk.

### **TERAPIA DEL SK.**

Muchos pacientes con sk no mueren como consecuencia directa del tumor, sino por infecciones oportunistas asociadas al VIH, aunque cuando existe afectación visceral (pulmonar) la supervivencia es más corta y la causa de la muerte puede tener una relación más directa con el tumor (Carriedo, C., et. al., 1993), por lo cuál el tratamiento del sk está indicado en las siguientes circunstancias: si ocasiona problemas cosméticos, lesiones dolorosas (oral, faringe, plantas de los pies) grandes masas de tumor, linfedema (cara, extremidades , genitales), afectación pulmonar o enfermedad rápidamente progresiva (Kaplan, L.D., 1989).

Las opciones terapéuticas incluyen tratamientos locales o sistémicos: En los sistémicos debe ser valorada la toxicidad e inmunodepresión, lo cuál puede favorecer el desarrollo de infecciones oportunistas.

### **TERAPIA LOCAL.**

El tratamiento local es estrictamente paliativo y está dirigido a eliminar lesiones individuales por razones cosméticas que interfieren con la calidad de vida del paciente o porque producen alteraciones funcionales. Entre éstas se encuentran la radioterapia, quimioterapia intralesional, crioterapia o excisión quirúrgica.

Aunque la desaparición completa de las lesiones es inusual, se obtiene respuesta satisfactoria. La recurrencia con el tiempo es más un reflejo de la historia natural de la enfermedad en pacientes con SIDA que un fracaso de la terapia. Parece que son igualmente eficaces las dosis de radiación únicas y las dosis fraccionadas (Berson, A.M., et. al., 1988).

Las dosis simples de radiación (800cGy) o cantidades mayores (2500 - 3000 cGy) pueden producir la regresión de las lesiones en un periodo corto de tiempo. Con lesiones localizadas en la piel se han obtenido respuestas globales a la radioterapia en el 85 al 95% de los casos (Berson, A.M., et. al., 1988).

En la crioterapia se han descrito respuestas favorables en el 80% de las lesiones tratadas (Tapperos. W., et. al., 1991).

La vinblastina y la vincristina se utilizan en dosis de 0.01 - 0.1 mg. Se pueden obtener respuestas completas en el 60% de los casos y parciales en el 92% (Schofer, H., et. al., 1991) con la primera y 20 % con la segunda sin causar daños hematológicos o inmunológicos significativos. Los efectos secundarios son dolor local e irritación de la piel.

La excisión quirúrgica de lesiones en pies, en áreas de flexión o extensión, o la conjuntiva es relativamente segura.

### **TRATAMIENTO SISTEMICO.**

Está indicado en pacientes con enfermedad progresiva, con enfermedad sintomática diseminada o cuando existe afectación visceral. En éste se incluyen el interferón alfa (sólo o combinado con tratamiento antirretroviral) y con quimioterapia (Safai, B. et. al., 1992).

El INF alfa es un agente antineoplásico activo ante el sk con una actividad antivírica (inhibe la replicación del VIH) e inmunomoduladora (induce la citotoxicidad mediada por células T, aumenta la actividad de las células asesinas y modifica la función de los macrófagos) (Walker, R.D., et. al., 1992) y se ha descrito una actividad antiangiogénica (Sidky, T.A. and Borden, E.C., 1987). Se han empleado los diferentes tipos de INF alfa (n1, n2a y n2b) en el tratamiento de sk asociado al SIDA aplicado en dosis de 5 - 20 MU/600 - 1800 mg a dado una respuesta de los pacientes del 42 al 48 % cuando son cotratados con zidovudina.

Uno de los inconvenientes principales del IFN alfa cuando se utiliza en dosis altas es la considerable toxicidad y mala tolerancia en un número importante de pacientes. El efecto secundario más frecuente es el síndrome pseudogripal, con fiebre, astenia, anorexia, cefalea y malestar general. Otros efectos secundarios son náuseas, diarrea, leucopenia, hepatotoxicidad y cambios leves del estado mental. Puede ser aplicado por vía subcutánea, intramuscular e intravenosa (De Wit, R., et. sl., 1988). El INF alfa y la zidovudina tienen una actividad sinérgica al VIH tanto *in vitro* como *in vivo*.

### **EL FIBROQUEL.**

En 1970, Fichtelius sugirió que la piel podría funcionar como un órgano linfoide de primer nivel comparable al timo. Aunque este concepto no ha sido aceptado, otros investigadores han propuesto la existencia de tejidos linfoides asociados a la piel en los que se

incluyen a los queratinocitos, a las células de Langerhans como células presentadoras de antígeno, a las células T de la piel de las que se sospecha su existencia desde las primeras observaciones de los procesos tumorales cutáneos de las mismas, a las células endoteliales de la piel que dirigen a las células T a la dermis y finalmente a los linfonodos. Posteriormente en 1986 fue propuesto el término "sistema inmune de la piel" para describir la complejidad de las células asociadas a la respuesta inmune y factores humorales presentes en la piel normal. Así, se han descrito los constituyentes de la inmunidad celular y humoral del sistema inmune de la piel. En lo que se refiere a la inmunidad celular se incluyen a los queratinocitos fibroblastos, macrófagos, monocitos, granulocitos, células de Langerhans, células dendríticas, células T, y células endoteliales y en la inmunidad humoral a las interleucinas, interferones, inmunoglobulinas, factores estimuladores de las colonias, etc. Histológicamente el área perivascular de las vénulas postcapilares de la dermis papilar, la dermis profunda y los apéndices de la piel contienen la más alta concentración de células relacionadas a la respuesta inmune del integumento. En estos sitios cercanos a las células endoteliales, los monocitos, macrófagos y células T están frecuentemente presentes. Además, pueden observarse células dendríticas del tejido que podrían estar relacionadas a las células de Langerhans. En muchas enfermedades inflamatorias de la piel estos centros de reactividad perivascular se expanden y se encuentran presentes en enfermedades dermatológicas tales como la vasculitis linfocítica, lupus eritematoso cutáneo, eritema exudativo multiforme, etc. Cuando se presenta daño epitelial se producen una cantidad elevada de citocinas y como resultado de esto las células endoteliales incrementan la expresión de moléculas de adhesión necesarias para la inmigración de leucocitos de la circulación. Los tratamientos dermatológicos han sido substancialmente mejorados con la introducción de nuevas inmunoterapias entre las que se incluyen el uso de ciclosporinas, anticuerpos monoclonales, fotoféresis extracorporeal para el tratamiento de escleroderma, psoriasis, dermatitis atópica, pioderma gangrenoso, cicatrices hipertróficas y/o queloides y muchas otras (Bos, D.J. and Kapsenberg, L.M., 1993).

Actualmente se han estado estudiando los efectos de un nuevo fármaco llamado Fibroquel<sup>MR</sup>, en el tratamiento de algunas de las enfermedades de la piel anteriormente descritas.

El Fibroquel<sup>MR</sup> es una mezcla irradiada de colágena porcina tipo I y polivinilpirrolidona (PVP) que, al ser aplicado por vía intramuscular o vía subcutánea es degradado en el espacio extracelular por la colagenasa y los péptidos generados son a su vez degradados por la



gelatinasa y otras enzimas inespecíficas produciendo oligopéptidos y aminoácidos libres. Por otra parte la PVP es un polímero inerte que se excreta aproximadamente en un 95% por vía urinaria en un período menor a 24 horas.

En cultivos de macrófagos y fibroblastos, tratados con Fibroquel<sup>MR</sup>, se observa en los fibroblastos un aumento en la síntesis de colágena y una disminución en su actividad colagenolítica, mientras que en los macrófagos la actividad colagenolítica se ve incrementada. Este fármaco, aplicado en piel de rata lesionada quirúrgicamente, al 5º día se observa un incremento del tejido de granulación y rearreglo de las fibras de colágena y en el 14º día se observan además anexos cutáneos, glándulas sebáceas y folículos pilosos, siendo posible que el rearreglo de las fibras de colágena se deba a su capacidad de recambio (Krötzsch, G.E., et. al., 1993).

En humanos el Fibroquel<sup>MR</sup> ha sido aplicado en cirugía reconstructiva, tratamiento de la contractura del tendón de Aquiles y tratamiento de fibrosis dérmica o cicatrización hipertrófica y/o queloide observándose disminución del tejido cicatricial y regeneración tisular. En el tratamiento de la contractura del tendón de Aquiles, el tratamiento actual incluye terapia física, uso de moldes nocturnos o cirugía para alargar el tendón. En el estudio realizado para determinar los efectos del Fibroquel<sup>MR</sup> en el tratamiento de la contractura del tendón de Aquiles se trataron 21 niños a quienes se les administro el fármaco en una dosis de 0.2 ml por semana durante 8 semanas. Se observó que el Fibroquel<sup>MR</sup> es capaz de reducir la contractura del tendón aumentando la amplitud del arco de movilidad del tobillo de 5º a 20º en un caso y de 5º a 10º en el resto de los casos; además corrigió el patrón de marcha y posición neutra del pie (Hernández, P.N., 1992).

En cicatrices hipertróficas y queloides, al aplicar por vía intralesional 0.2 ml de Fibroquel<sup>MR</sup> por cada 5 cm de cicatriz, cada semana, y algunas veces hasta por 6 meses, se observó disminución y eliminación de la sensación urente, prurito, normocromía, reblandecimiento y eliminación del exceso de fibras. Histológicamente se observó disminución de la cantidad de colágena depositada y arreglo de las fibras de colágena semejante a la piel normal, disminución del infiltrado celular y corrección en el contorno epidérmico (Díaz de León, L., et. al., 1994).

Por otra parte en el sobrenadante de cultivos de fibroblastos derivados de cicatrices hipertróficas y queloides tratadas con Fibroquel<sup>MR</sup>, el TGFβ disminuyó en un 60% y el PDGF-AB disminuyó un 80% alcanzando niveles semejantes a los de la piel normal (Kötzsch, G.E., et. al, 1996).

En otros estudios se ha demostrado que el Fibroquel<sup>MR</sup> también es capaz de disminuir parcialmente la expresión de moléculas de adhesión como son ELAM-1 y VCAM-1 en las cicatrices hipertróficas y queloides en las cuáles los niveles de estas moléculas se encuentran significativamente elevados (Furazawa-Carballeda, J.G. et. al, 1996).

## II. HIPOTESIS.

Si las citocinas y moléculas de adhesión vascular son factores determinantes de la proliferación de las células encontradas en las lesiones de sarcoma de Kaposi, entonces el Fibroquel<sup>MR</sup> dada su acción sobre estas citocinas y moléculas de adhesión inducirá modificaciones en las lesiones tratadas localmente con este biofármaco.

### III. OBJETIVOS.

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar los efectos de Fibroquel<sup>MR</sup> *in vitro* e *in vivo* en el sarcoma de kaposi asociado a SIDA.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS "IN VITRO".**

- Determinar la toxicidad del Fibroquel<sup>MR</sup> en líneas celulares Hut 78, HeLA-CD4+ y SK4.
- Determinar el efecto del Fibroquel<sup>MR</sup> en la replicación del VIH-1 en células Hut 78.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS "IN VIVO".**

- Evaluar la evolución de lesiones de sarcoma de kaposi en pacientes con SIDA tratados con Fibroquel<sup>MR</sup> por vía intralesional.
- Evaluar el efecto del Fibroquel<sup>MR</sup> en los niveles de linfocitos CD4+, CD8+, linfocitos B, linfocitos T activados, células asesinas y monocitos en controles sanos no infectados y pacientes VIH-1 positivos con sarcoma de kaposi.
- Evaluar la hepatotoxicidad del Fibroquel<sup>MR</sup> en controles sanos no infectados y en pacientes VIH-1 positivos con sarcoma de kaposi.

#### IV. MATERIAL Y METODOS.

**CULTIVO DE LA LINEA CELULAR KS4.** Las células KS4 (Dra. Barbara Ensoli National Cancer Insitute, Betheseda Ma. USA) se cultivaron en medio RPMI 1640 con glutamina (Gibco) y 15 % de suero fetal de ternera (Hyclone ), complementado con 1% fungizona (Gibco), 1% piruvato de sodio (Gibco), 1% aminoácidos esenciales y no esenciales (Gibco), 1% nutridoma HU (Boehringer Mannheim) y oncostatina M diluida 1:1000 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) (MEDIO KS). Se emplearon frascos F75, los cuáles se cubrieron con solución de gelatina (SIGMA) al 1.5 % en H<sub>2</sub>O y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Al día siguiente se aspiró la gelatina y se enjuagó con medio RPMI. Posteriormente se descongelaron las células KS4 y se transfirieron a 10 ml de RPMI al 10 % con suero fetal de cabra. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Posteriormente se resuspendieron en 16 ml de medio KS y se adicionaron las células al F75 las cuáles se incubaron a 37 °C durante 24 hrs. Cuando las células se hicieron confluentes se aspiró el medio del frasco, se enjuagó con PBS y se adicionaron 3 a 5 ml de tripsina (SIGMA) al 4 %, cubriendo toda la superficie del frasco. Se incubó a 37 °C durante 2 min y posteriormente se adicionaron 20 ml de PBS (PBS sin Ca<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ) al frasco. Se pasaron las células a un tubo y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se pasaron a un F75 y se resuspendieron en medio KS. Se incubaron a 37 ° C durante 24 horas y al siguiente día se cambió el medio.

**TOXICIDAD DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN LINEAS CELULARES.** Se emplearon 2 X 10<sup>4</sup> células HeLa-CD4+ , 4 X 10<sup>3</sup> células de sarcoma de kaposi (KS4) y 2 X 10<sup>5</sup> células Hut 78, se cultivaron por separado en cajas de 24 pozos hasta alcanzar un 80 % de confluencia. Posteriormente se adicionó el Fibroquel<sup>MR</sup> al 25, 12.5, 6.25, 3.12% y 0% y se incubó durante 48 horas a 37°C. Se removió el medio de cultivo de las células HeLa-CD4+ y KS4, se fijaron con formaldehido al 5% en PBS durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 5 minutos. Se lavaron con agua corriente. Para obtener una distribución homogénea del colorante se adicionaron 100µl de ácido acético glacial al 33% y se agitó por 10 minutos. Se midió la absorbancia en lector de ELISA a una longitud de onda de 580 nm. Las células Hut 78 se tiñeron con azul tripano y

se contaron en cámara de Neubauer. Se calculó el % de muerte celular con respecto al control de células no tratadas con Fibroquel<sup>MR</sup>.

**EFEECTO DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN LA REPLICACION VIRAL.** Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células Hut 78 infectadas con el virus IIIb en cajas de 24 pozos y se adicionó por duplicado Fibroquel<sup>MR</sup> al 6.25%, 3.125, 1.562, 0.78 % y 0%. Se cultivó durante 14 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se obtuvieron alícuotas de sobrenadante los días 1, 2, 3, 7, y 14, y se determinó la concentración de antígeno p24. Se contaron las células vivas y muertas mediante tinción con azul tripano.

**DETERMINACION DE ANTIGENO.** La determinación de antígeno se realizó mediante el uso del estuche para la detección de Ag p24 de VIH-1 por Ensayo Inmunoenzimático de Elisa (Sanofi Diagnostics Pasteur) y de acuerdo al protocolo establecido, utilizando los sobrenadantes obtenidos los días 1, 2, 3, 7 y 14 de los cultivos de las células Hut 78 tratadas con Fibroquel<sup>MR</sup>.

**SELECCIÓN DE PACIENTES.** Los pacientes con sk. que participaron en el estudio fueron seleccionados de la consulta externa del departamento de infectología del Instituto Nacional de Cancerología y tomando en consideración que presentaran un sk de tipo nodular en etapa inicial y sin complicaciones de edema u otras infecciones secundarias para evitar poner en riesgo su vida. Primero se determinaron anticuerpos anti-VIH mediante el uso del ensayo de aglutinación Serodia (Fujirebio Inc.) y mediante la técnica de Western Blot para confirmar la infección por el VIH en los pacientes con sk. Los tres pacientes tenían tratamiento antirretroviral con AZT y aceptaron participar en el estudio, voluntariamente, después de que se les informaron los antecedentes del fármaco, los objetivos que se pretendía alcanzar con el estudio, el esquema de aplicación del fármaco y las muestras que se deberían colectar durante el tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>. Los controles eran tres personas sanas VIH negativas que accedieron de manera voluntaria a aplicarse el fármaco en el mismo esquema de aplicación que el de los pacientes con sk. La aplicación del fármaco en los controles fue subcutánea en una área de piel seleccionada por ellos mismos. Tanto los enfermos como los controles firmaron una hoja de consentimiento.

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI VIH.** La determinación de anticuerpos en plasma se realizó mediante el ensayo de aglutinación SERODIA y Western Blot preparado en la UIRH conforme al protocolo establecido.

**APLICACION DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN PACIENTES VIH POSITIVOS CON SARCOMA DE KAPOSI Y EN CONTROLES.** Para la valoración del efecto del Fibroquel<sup>MR</sup> "in vivo" se trataron 3 pacientes con SIDA que presentaban lesiones de sk y tres controles sanos, a quienes se les aplicó el Fibroquel<sup>MR</sup> en una dosis de 0.2 ml cada tres días durante un tiempo de 2 meses. En los pacientes se aplicó en una lesión de sk. Se obtuvieron muestras de sangre tanto de los pacientes como de los controles al tiempo 0, 1, 2 y 3 meses. De los pacientes se obtuvieron biopsias de la lesión tratada al tiempo 0 y al mes de tratamiento. Las biopsias se tiñeron con hematoxilina y eosina y fueron examinadas por 3 diferentes patólogos. A partir de la sangre se realizaron las siguientes pruebas: biometría hemática, pruebas de funcionamiento hepático, inmunotipificación de receptores CD4+, CD8+, HLA-DR, CD19+, CD56+/CD16+ y CD14. Los resultados cuantitativos y cualitativos se evaluaron mediante análisis estadístico utilizando análisis de varianza mediante el uso del programa SAS en computadora PC.

**CITOMETRIA DE FLUJO.** Para la determinación de estos parámetros se emplearon anticuerpos monoclonales: a) CD3-FITC/CD4-PE, b) CD3-FITC/CD8-PE, c) CD3-FITC/CD19-PE, d) CD3-FITC/anti-HLA-DR-PE, e) CD3-FITC/CD16+CD56-PE, f) CD45-FITC/CD14-PE, g) Control IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>2a</sub> (Becton Dickinson). En un tubo de ensayo se colocaron 100 µl de sangre completa (colectada en tubos vacutainer con EDTA) y 10 µl del anticuerpo, cada uno por separado. Se incubó a temperatura ambiente y en la obscuridad durante 45 minutos, posteriormente se lisaron los eritrocitos, y se fijaron las células empleando el sistema Coulter Q-Prep. La lectura se realizó empleando un citómetro de flujo EPICS PROFILE II (COULTER).

**BIOMETRIA HEMÁTICA.** Se realizó mediante el uso del aparato COULTER<sup>®</sup> MAXM conforme al protocolo establecido.

**QUÍMICA SANGUÍNEA.** Se realizó mediante el uso del aparato Spectrum (ABBOTT) conforme al protocolo establecido.

**OBTENCION DE LINFOCITOS NORMALES (LN).** Se obtuvieron las PBMC por gradiente de ficoll de un concentrado leucocitario de un donador VIH, Hepatitis B negativo del Centro Nacional de la Transfusión Sanguinea. Se lavaron dos veces con PBS y se dividieron en tres porciones colocándose en frascos de cultivo F75 con 40 ml de medio RPMI complementado con 20 % de suero fetal bovino (GIBCO) se adicionaron 5 mg/ml de fitohemaglutinina (Sigma, Co) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al final de la incubación se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min en tubos de 50 ml, se resuspendieron en 5 ml de PBS y se contaron en cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripano (INC Biochemicals) haciendo una dilución 1:10: Se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en la cantidad de medio de congelación (90% suero fetal bovino y 10% DMSO) adecuada para tener de 10 a 12 x 10<sup>8</sup> células por ml de medio de congelación. Se mantuvieron a -70°C durante 24 hrs y posteriormente se colocaron en nitrógeno líquido. Para la alimentación de los cocultivos se descongelaron los LN y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con 20 % de suero. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 5 ml de RPMI1640 con polibrén (Sigma) durante 30 min a 37 °C en atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en medio de cultivo con IL-2 humana recombinante 5 UI/ml.

**COCULTIVO.** Las muestras de sangre de los 3 pacientes con sk (Psk1, Psk2, Psk3) fueron obtenidas en condiciones estériles y en tubos con heparina (Vacutainer 16 x 100 Becton Dickinson). Se diluyeron con PBS 1:1 y se sometieron a gradiente de ficoll colocando 10 ml de sangre diluida en tubos de 15 ml conteniendo 5 ml de Histopaque (Sigma Diagnostics) dejando estratificar la muestra. Se centrifugó durante 30 min a 1200 rpm y evitando el freno del rotor. Se separó el plasma y las PBMC se extrajeron con pipeta pasteur y se colocaron en tubos de 15 ml. Se lavaron con 10 ml PBS, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se repitió el procedimiento una vez más. Las células se contaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino con IL-2 25 U/ml recombinante humana (Sigma Cell Culture) para obtener una concentración de 250,000



células por ml. En frascos F25 se estableció el cocultivo colocando las células de los pacientes y los LN en una proporción 1:4. en 4 ml de medio RPMI con IL-2. El cocultivo se alimentó en un inicio con 500, 000 LN y posteriormente en una proporción 1:1. Se determinó la cantidad de Ag p24 (Sanofi) en los sobrenadantes cada 15 días.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO.

En base a las recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica que involucre seres humanos en relación a la adaptada en la 18a. ASAMBLEA MEDICA MUNDIAL HELSINKI: Finlandia 1964 y al revisado por la ASAMBLEA MEDICA MUNDIAL DE TOKIO-JAPON EN 1975.

Yo \_\_\_\_\_ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio: Efecto del Fibroquel<sup>MR</sup> en el sarcoma de kaposi asociado a SIDA, que se realizará en las Instituciones INC, UNAM; INDRE, cuyos objetivos consisten en: Evaluar los efectos del Fibroquel<sup>MR</sup> en la resolución de lesiones de sarcoma de kaposi. Estoy consciente de que los procedimientos, pruebas y tratamientos para lograr los objetivos mencionados consistirán en: aplicación del fármaco vía intralesional, toma de biopsias, sangre, pruebas de laboratorio: biometría hemática, química sanguínea, serología, cultivo y citometría y que los riesgos a mi persona serán: Ninguno. Entiendo que del presente estudio se derivaran beneficios para: mi persona y otras personas en condiciones iguales a las mías. Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que yo así lo desee. También que podré solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en este estudio. En caso que decidiera retirarme de la investigación, la atención que como paciente recibo en esta institución, no se verá afectada.

### Datos del paciente.

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

### Datos de los Testigos.

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

## V. RESULTADOS.

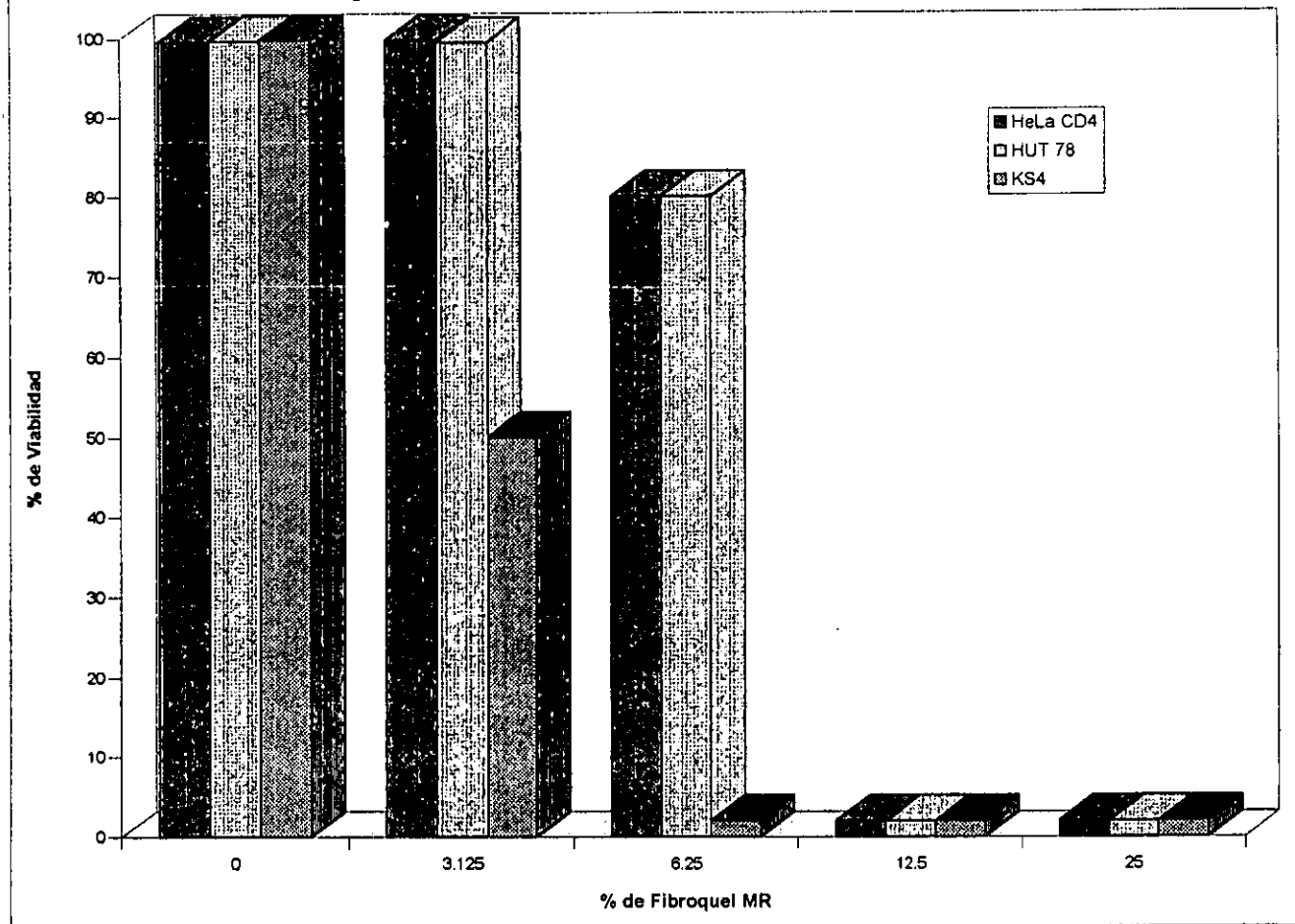
**TOXICIDAD DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN LINEAS CELULARES.** Para determinar la toxicidad del Fibroquel<sup>MR</sup> en las líneas celulares Hut-78, HeLa-CD4+ y KS4 se realizaron cultivos celulares a los cuáles se les agregó Fibroquel<sup>MR</sup> en porcentajes de 3.125, 6.25, 12.5, y 25. Después de la incubación se determinó el % de viabilidad y las diferencias entre las medias aritméticas fueron evaluadas por una prueba de Tuckey. Se observó que los porcentajes de Fibroquel<sup>MR</sup> de 12.5 y 25% fueron igualmente tóxicos para las tres líneas celulares empleadas y los porcentajes de 3.25 y 6.25 fueron 50% y 90% más tóxicos para la línea celular KS4 comparados con las líneas celulares Hut-78 y HeLa-CD4+ para las cuales resultaron ser igualmente tóxicos (Figura 1).

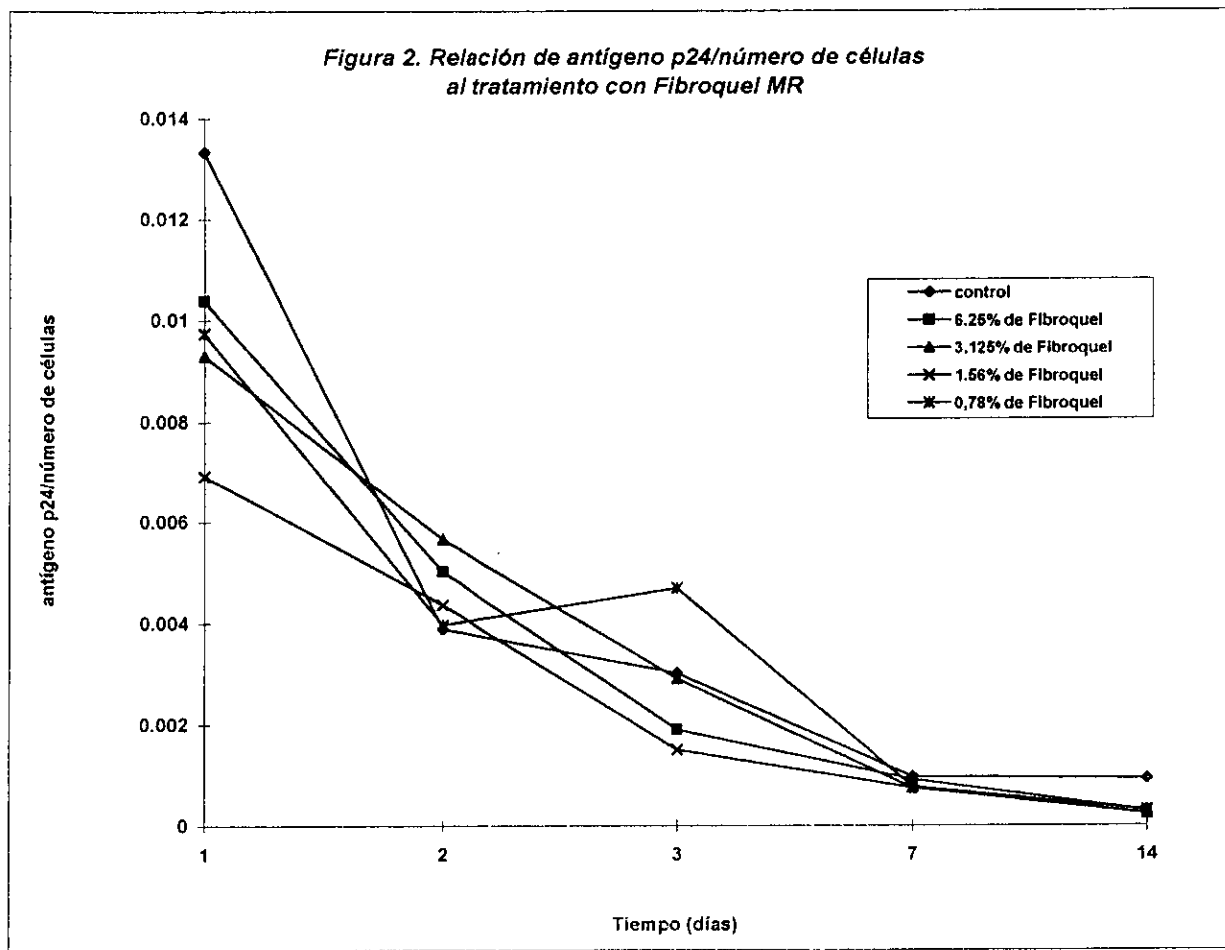
**EFECTO DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN LA REPLICACION VIRAL.** Para determinar si el Fibroquel<sup>MR</sup> podría influir en la replicación del VIH-1 se cultivaron células Hut-78 permanentemente infectadas con el virus IIIb a las cuáles se les añadió Fibroquel<sup>MR</sup> en porcentajes de 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 y se midió Ag p24 en alícuotas del sobrenadante obtenidas los días 1, 2, 3, 7 y 14. Se observó que la producción de Ag p24 no es afectada por la presencia del Fibroquel<sup>MR</sup> (Figura 2).

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-VIH.** Se realizó la determinación de anticuerpos anti-VIH mediante el uso del estuche Serodia y la técnica de Western Blot. Los tres pacientes con sk eran positivos a VIH-1 y fueron confirmados por Western Blot presentando un patrón completo de proteínas de VIH. (Figura 3).

**PARAMETROS INMUNOLOGICOS DE LOS PACIENTES VIH POSITIVOS CON SK Y DE LOS CONTROLES.** Para valorar los efectos del Fibroquel<sup>MR</sup> en el sistema inmunológico tanto de los pacientes con SIDA, así como de los controles sanos, se inmunotipificaron los antígenos CD4, CD8, HLA-DR, CD19, CD56-CD16 y CD14 mediante citometría de flujo al tiempo 0, 1, 2, y 3 meses. Los resultados obtenidos en porcentajes se sometieron a análisis estadístico mediante una prueba de análisis de varianza con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Se encontró que existió diferencia significativa en los

Figura 1. Toxicidad del Fibroquel MR en líneas celulares





**Figura 3. Determinación de anticuerpos anti-VIH-1 por Western Blot y Serodía en los pacientes con sarcoma de kaposi.**

gp160					
gp120	==		-	==	-
p66	==			==	
p55	==			==	
p51	==			==	
gp41					
p31					
p24					
p17					
	C+	C-	PSK1.0	PSK2.0	PSK3.0
SERODIA	+	-	+	+	+

C+ control positivo, C- control negativo, Psk1, Psk2, Psk3 pacientes con sarcoma de kaposi.

parámetros CD8 y CD14 tanto en los controles como en los pacientes con sk. En los pacientes con sk también se encontró diferencia significativa en CD4 y CD19. (Tabla 1).

**QUIMICA SANGUINEA.** Para medir los posibles efectos adversos del Fibroquel<sup>MR</sup>, se realizaron determinaciones de fosfatasa alcalina, gama glutamil transferasa, globulina, transaminasa glutámico pirúvica, relación albúmina/globulinas, proteínas totales, deshidrogenasa láctica, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, albúmina al tiempo 0, 1, 2, y 3 meses. Los resultados obtenidos se sometieron a una prueba de análisis de varianza con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . No se observó diferencia significativa en ninguno de los parámetros medidos en los controles y tampoco en los pacientes con sk (Tabla 2).

**BIOMETRIA HEMATICA.** Para medir los efectos adversos del Fibroquel<sup>MR</sup> se realizaron determinaciones de eritrocitos, plaquetas, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración media de hemoglobina corpuscular, monocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos al tiempo 0, 1, 2, y 3 meses. Los resultados obtenidos se sometieron a una prueba de análisis de varianza con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . No se observó diferencia significativa en ninguno de los parámetros medidos en los controles y tampoco en los pacientes con sk (Tabla 3).

**EFEECTO DEL FIBROQUEL<sup>MR</sup> EN LAS LESIONES DE SARCOMA DE KAPOSI.** Se aplicó Fibroquel<sup>MR</sup> a tres pacientes con sarcoma de kaposi en una de sus lesiones en una dosis de 0.2 ml cada 3 días durante 2 meses. En los tres pacientes se observó aclaramiento del color de la lesión acompañado con descamación al mes de tratamiento. Los tres pacientes reportaron disminución del dolor en la lesión y ardor al momento de la aplicación (Figuras 4, 5, 6 y 7).

**ANALISIS HISTOPATOLOGICO DE LAS LESIONES DE SARCOMA DE KAPOSI AL INICIO Y AL MES DE TRATAMIENTO CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>.** Al tiempo 0 es posible observar en las biopsias, de las lesiones que fueron tratadas, estructuras características del sk como son grietas y hendiduras vasculares, canales vasculares creciendo alrededor de anexos y células endoteliales neoplásicas (Figuras 8, 9

**TABLA 1**  
**EXPRESION DE RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR DE LOS**  
**PACIENTES VIH-1 POSITIVOS CON SK Y DE LOS CONTROLES TRATADOS**  
**CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>**

	% CD4	% CD8	% CD19	% CD16/CD56	% CD14	% HLA-DR
V.R.	29 - 57	11 - 38	1.2-20.4	5.6 - 30		3.5 - 20.6
C <sub>1,0</sub>	39	27	24	10	11	28
C <sub>1,1</sub>	37	27	25	14	11	31
C <sub>1,2</sub>	41	26	20	14	3	23
C <sub>1,3</sub>	42	24	26	11	2	26
C <sub>2,0</sub>	44	30	10	18	10	13
C <sub>2,1</sub>	46	28	10	12	8	13
C <sub>2,2</sub>	42	29	8	19	6	13
C <sub>2,3</sub>	48	24	9	18	3	15
C <sub>3,0</sub>	43	31	12	16	18	18
C <sub>3,1</sub>	45	30	15	16	14	18
C <sub>3,2</sub>	45	31	11	18	3	15
C <sub>3,3</sub>	46	25	11	21	5	15
MEDIA	43.2	27.7	15.08	15.58	7.83	19
D.E.	1.82	0.96	1.491	2.603	2.53	2
P<0.05	0.2180	0.0026	0.1084	0.469	0.0072	0.242
Psk <sub>1,0</sub>	0.6	40	45	4	11	60
Psk <sub>1,1</sub>	2.2	76	44	5	12	35
Psk <sub>1,2</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Psk <sub>1,3</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Psk <sub>2,0</sub>	2.4	70	8	6	31	17
Psk <sub>2,1</sub>	2.4	72	10	20	34	33
Psk <sub>2,2</sub>	2	70	13	9	77	25
Psk <sub>2,3</sub>	2	69	11	9	13	28
Psk <sub>3,0</sub>	0.6	75	17	6	13	40
Psk <sub>3,1</sub>	1	79	15	19	10	48
Psk <sub>3,2</sub>	0.6	70	22	5	77	38
Psk <sub>3,3</sub>	1	70	20	5	12	42
MEDIA	1.577	72.33	17.78	9.33	31	34
D.E.	0	0.687	0	6.46	0	4.09
P<0.05	0	0.006	0.0001	0.4902	0.0143	0.2114

C. controles. Psk. paciente VIH+con sarcoma de kaposi. Los números antes del punto diferencian a cada uno de los controles y de los pacientes. Los números después del punto indican el tiempo (meses) en el que fue tomada la muestra para el análisis. ND. No determinado por muerte del paciente. D.E. Desviación estándar. V.R. Valores de Referencia: No han sido determinados en la población mexicana. Estos valores de referencia corresponden a una población de hombres entre 18 y 70 años de edad de Baja California, Estados Unidos y Europa.



**TABLA 2**  
**RESULTADOS DE LA QUIMICA SANGUINEA DE LOS PACIENTES VIH-1**  
**POSITIVOS CON SK Y DE LOS CONTROLES TRATADOS**  
**CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>**

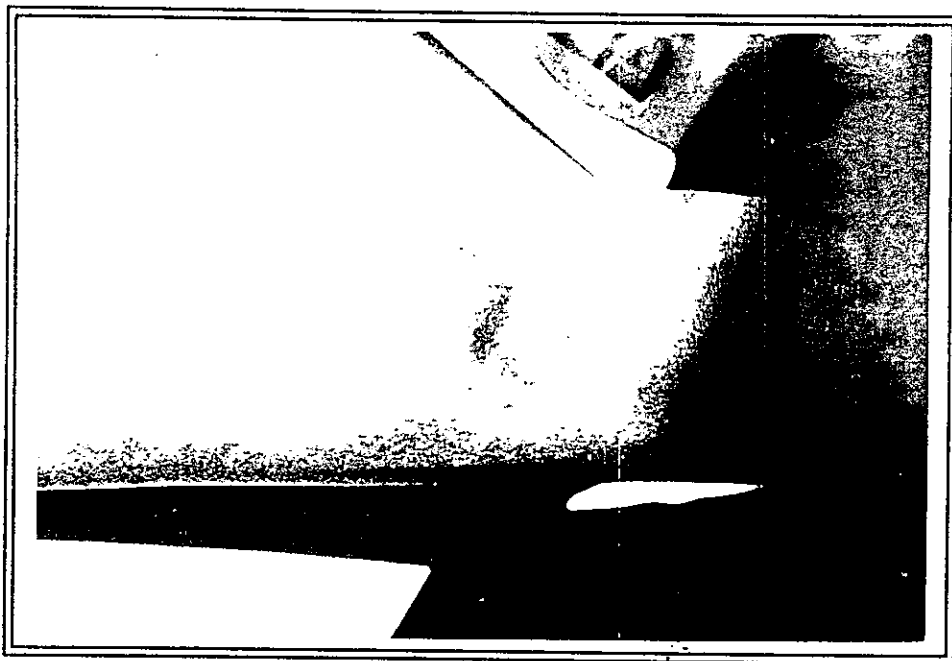
	FA	GGT	GLOB	TGP	TGO	A/G	PROTT	DHL	BD	BI	ALB
V.R.	32-130 UI/L	11-63 UI/L	2.3-3.5 g/DL	3-69 UI/L	8 - 46 UI/L	1.1-1.9	6.5-8.4 g/DL	101-206 UI/L	0.1-0.4 mg/dl	0.2-1.6 mg/dl	3.4-4.8 g/dl
C <sub>1,0</sub>	88	14	3.2	37	17	1.5	8.1	152	0.8	0.8	4.9
C <sub>1,1</sub>	78	11	2.8	43	18	1.7	7.5	123	0.6	0.8	4.7
C <sub>1,2</sub>	81	ND	3.2	40	21	1.6	8.2	169	1.5	1.1	5
C <sub>1,3</sub>	73	10	2.6	24	21	1.8	7.3	147	1.2	1	4.7
C <sub>2,0</sub>	97	12	3.5	25	24	1.3	8	149	0.7	0.6	4.5
C <sub>2,1</sub>	88	11	3.3	27	26	1.4	8	121	0.6	0.5	4.7
C <sub>2,2</sub>	84	ND	3.6	16	21	1.2	7.9	152	0.7	0.3	4.3
C <sub>2,3</sub>	73	14	3.3	25	28	1.3	7.7	158	0.7	0.4	4.4
C <sub>3,0</sub>	81	46	3.3	75	45	1.5	8.2	217	0.6	0.6	4.9
C <sub>3,1</sub>	66	30	3	74	35	1.4	7.1	168	0.4	0.3	4.1
C <sub>3,2</sub>	72	ND	3.7	49	42	1.2	8.2	215	0.8	0.4	4.2
C <sub>3,3</sub>	69	35	3.3	43	42	1.3	7.7	199	0.5	0.4	4.4
Media	79.16	20.3	3.23	39.8	28.33	1.43	7.82	164.16	0.60	0.75	4.56
D.E.	3.9	4.43	0.151	9.03	3.38	0.110	0.30	7.95	0.151	0.200	0.250
P<0.05	0.986	0.29	0.263	0.151	0.577	0.365	0.101	0.003	0.767	0.127	0.513
Psk <sub>1,0</sub>	173	112	3.6	49	102	0.9	7	271	0.5	0.3	3.4
Psk <sub>1,1</sub>	324	244	3.0	56	101	1.3	7	ND	0.6	0.3	4
Psk <sub>1,2</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Psk <sub>1,3</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Psk <sub>2,0</sub>	121	47	3.8	49	32	1.2	8.5	190	0.4	0.4	4.7
Psk <sub>2,1</sub>	123	38	4.4	43	45	1	9	244	0.2	0.4	4.6
Psk <sub>2,2</sub>	103	33	4.1	33	31	1	8.2	208	0.3	0.1	4.1
Psk <sub>2,3</sub>	127	51	3.8	36	37	1.1	7.9	ND	0.3	0.3	4.1
Psk <sub>3,0</sub>	94	339	4.5	47	44	1	9.1	236	0.4	0.3	4.6
Psk <sub>3,1</sub>	91	167	4.0	29	36	1.2	8.7	213	0.2	0.4	4.7
Psk <sub>3,2</sub>	89	150	4.0	36	26	1.1	8.3	159	0.2	0.1	4.3
Psk <sub>3,3</sub>	140	245	4.4	48	41	0.8	8.1	ND	0.2	0.2	3.7
MEDIA	138.50	142.60	3.96	42.60	49.50	1.060	7.18	217.28	0.33	0.28	4.22
D.E.	45.441	80.84	0.378	8.61	5.843	0.185	0.298	0.549	0.093	0.001	0.237
P<0.05	0.356	0.785	0.818	0.466	0.305	0.285	0.125	0.002	0.231	0.112	0.252

C. control sano. Psk. paciente con sarcoma de kaposi. Los números antes del punto diferencian a cada uno de los controles y de los pacientes. Los números después del punto indican el tiempo en el que fue tomada la muestra para el análisis. FA. fosfatasa alcalina, GGT. gamma glutamil transaminasa, GLOB. globulina, TGP. transaminasa glutámico pirúvica, TGO. transaminasa glutámico oxalacética, A/G. relación albumina globulina, PROTT proteínas totales, DHL. deshidrogenasa láctica, BD. bilirrubina directa, BI. bilirrubina indirecta, ALB. albúmina g/dl. ND. No determinado.

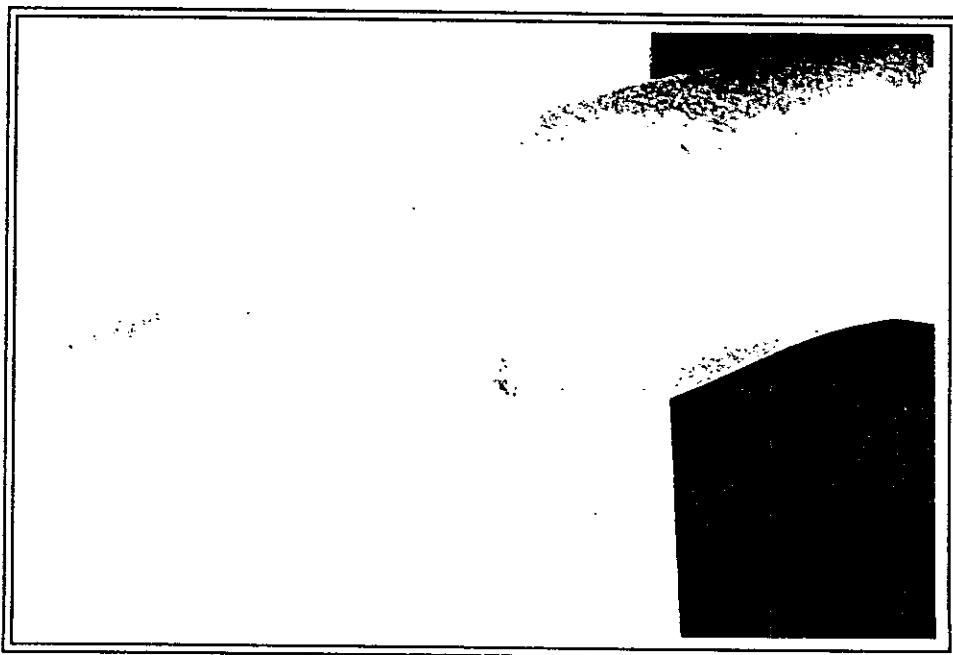
**TABLA 3**  
**RESULTADOS DE LA BIOMETRIA HEMATICA DE LOS PACIENTES VIH-1**  
**POSITIVOS CON SK Y DE LOS CONTROLES TRATADOS**  
**CON FIBROQUEL<sup>MR</sup>**

V.R	ERI	PLA	HEMO	HEMA	VCM	HCM	CHCM	MON	LEU	NEU	LIN	EOS	BAS
	4.7-6.1 x 10 <sup>6</sup>	130-400 x 10 <sup>3</sup>	14-18 g/DL	42-52 %	80-94 μ <sup>3</sup>	27-31 pg	33-37 g/dl	2-9 %	4.8-10.8 x 10 <sup>3</sup>	40-75 %	20-50 %	0-3 %	0-2 %
C <sub>1,0</sub>	4.92	216	15.7	46.3	93.6	31.8	34	7	5400	42	48	3	0
C <sub>1,1</sub>	5.68	179	17.8	54.7	96.2	31.4	33	5	4900	51	42	2	0
C <sub>1,2</sub>	5.25	230	16.8	50.1	95.5	32.1	34	7	4500	46	45	3	2
C <sub>1,3</sub>	4.99	154	15.5	46.4	93	31.1	34	4	5100	54	35	4	0
C <sub>2,0</sub>	5.47	171	15.8	47.4	86.7	28.9	33	5	4800	57	36	1	0
C <sub>2,1</sub>	5.81	166	17.1	49.9	85.9	29.5	34	6	4800	62	30	2	0
C <sub>2,2</sub>	5.75	178	16.7	50.5	87.8	29.1	33	7	4900	66	26	1	0
C <sub>2,3</sub>	5.67	132	16.5	49.7	87.7	29.1	33	6	3400	62	31	2	0
C <sub>3,0</sub>	5.68	190	16	47.4	83.3	28.1	34	12	5600	60	25	2	0
C <sub>3,1</sub>	5.66	195	16.1	49.9	84	28.4	34	10	4800	55	34	2	0
C <sub>3,2</sub>	5.72	174	15.8	50.5	83.8	27.6	33	10	5000	54	33	1	0
C <sub>3,3</sub>	5.93	162	16.1	48.9	82.4	27.1	33	8	4600	57	34	2	0
MEDIA	5.54	178.91	16.32	49.30	88.32	29.51	33.42	7.25	4816	55.50	34.91	2.08	0.16
D.E.	0.210	16.77	0.573	1.918	1.091	0.408	0.599	1.190	468.7	4.336	5.575	0.601	0.577
P<0.05	0.322	0.054	0.165	0.101	0.439	0.455	0.972	0.224	0.239	0.640	0.924	0.316	0.454
Psk <sub>1,0</sub>	4.05	120	12.5	37	91.2	30.7	33.7	7.9	4200	68.3	19.2	3.3	0.5
Psk <sub>1,1</sub>	3.99	102	12.6	36.4	91.2	31.6	34.6	6.2	5700	61.4	16.2	15.7	0.6
Psk <sub>1,2</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Psk <sub>1,3</sub>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Psk <sub>2,0</sub>	4.73	236	15.5	44.4	93.8	32.7	34.9	5.2	4300	50.3	42.3	2.2	0
Psk <sub>2,1</sub>	4.77	235	15.6	44.1	92.5	32.8	35.5	6	4700	52.9	38.1	2.8	0.2
Psk <sub>2,2</sub>	3.8	273	12.6	36.6	96.1	33	34.4	6.6	3700	44.4	43.4	5	0.6
Psk <sub>2,3</sub>	3.6	271	12	33.9	94	33.3	35.4	7.2	4200	53.6	36.3	2.9	0
Psk <sub>3,0</sub>	5.47	308	16.5	49.6	90.8	30.2	33.2	21.7	2200	35.9	41.6	0.4	0.4
Psk <sub>3,1</sub>	5.1	276	16	47.1	92	31.2	34	15.9	2800	46.1	36.4	1.1	0.5
Psk <sub>3,2</sub>	5.04	285	15.5	45.6	90.6	30.8	34	16	2300	33	48	3	0
Psk <sub>3,3</sub>	5.72	257	17.6	51.3	89.6	34.3	34.3	9.9	4500	72.5	16.9	0.7	0
MEDIA	4.59	236.30	14.64	42.60	92.18	32.06	34.40	10.52	3822	50.01	35.47	3.75	0.25
D.E.	0.455	22.718	1.435	3.888	1.321	0.981	0.356	3.789	342.5	9.923	3.709	0	0.265
P<0.05	0.899	0.061	0.928	0.908	0.619	0.163	0.119	0.602	0.445	0.239	0.032	0	0.466

C. control sano. Psk. paciente con sarcoma de kaposi. Los números antes del punto diferencian a cada uno de los controles y de los pacientes. Los números después del punto indican el tiempo en el que fue tomada la muestra para el análisis. ND. No determinado por falta de reactivo o por muerte del paciente. V.R. Valores de referencia. ERI eritrocitos, PLA plaquetas, HEMO hemoglobina, HEMA hematocrito, VCM volumen corpuscular medio, HCM hemoglobina corpuscular media, CHCM concentración corpuscular media de hemoglobina, MON monocitos, LEU leucocitos, NEU neutrófilos, LIN linfocitos, EOS eosinófilos, BAS basófilos.



*Figura 4. Lesión de sarcoma de kaposi al inicio del tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>.*



*Figura 5. Lesión de sarcoma de kaposi al mes de tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>.*



Figura 6. Lesión de sarcoma de kaposi al inicio del tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>.

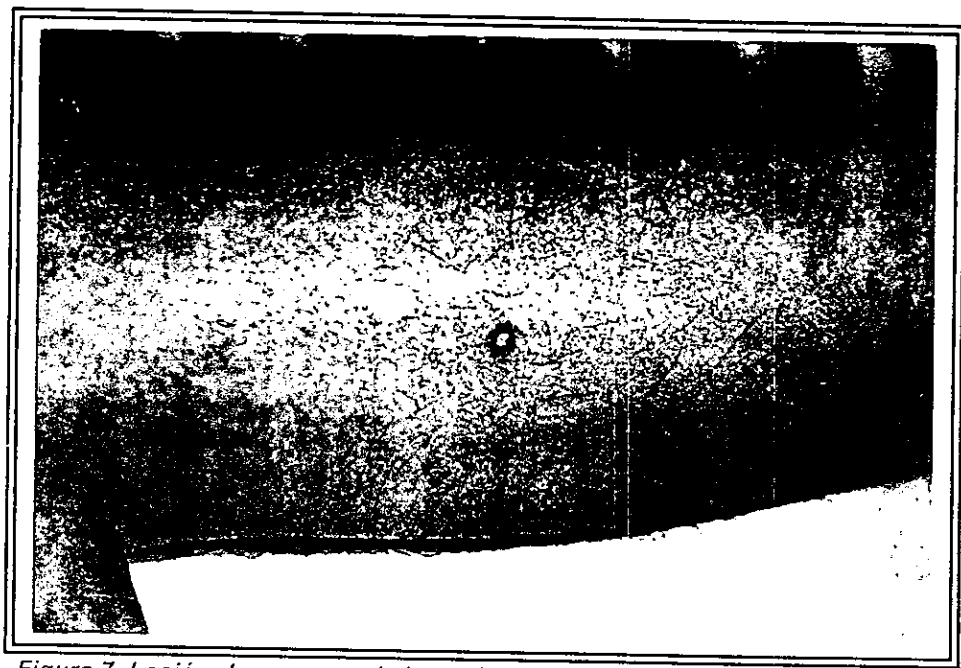


Figura 7. Lesión de sarcoma de kaposi al mes de tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>.

10, 11 y 12). Al mes de tratamiento es posible observar estroma edematoso laxo con escasas estructuras vasculares (Figuras 13, 14 y 15).



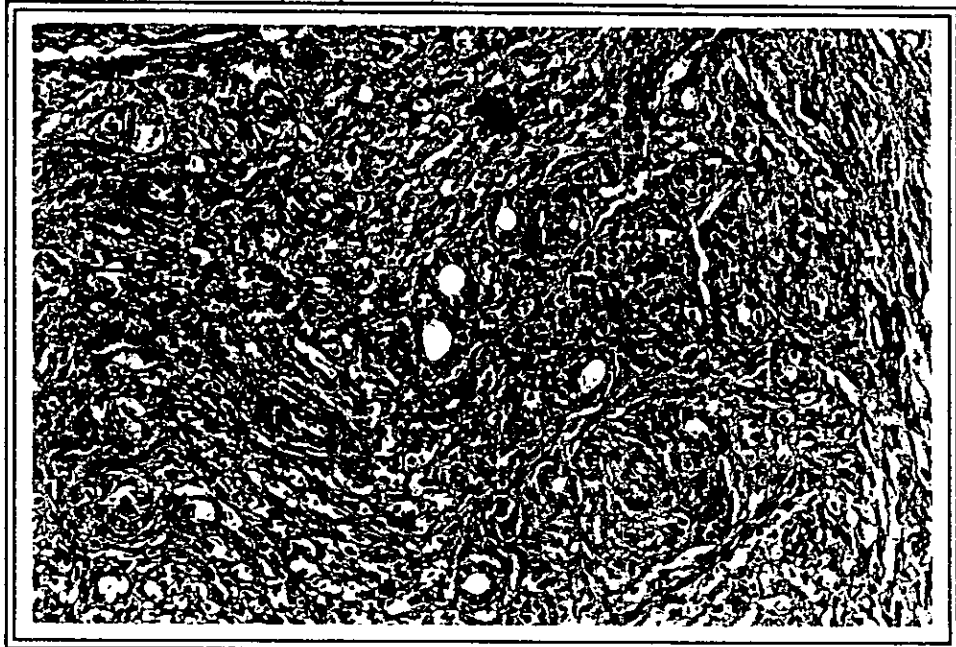
Figura 8. Crecimiento nodular de sarcoma de kaposi con vasos morfológicamente similares a capilares, en la parte superior derecha se observa "penacho" perivascular característico de proliferación de kaposi (pretratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>).



Figura 9. "grietas y hendiduras" vasculares con espacios claros de células endoteliales neoplásicas pre-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup> (H&E 600X).



*Figura 10. Sarcoma de Kaposi grado II combinación de estructuras vasculares semejando tejido de granulación con hendiduras vasculares en un patrón de crecimiento nodular denso pre-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup> (HE 600X).*



*Figura 11. Canales vasculares creciendo alrededor de los anexos que conservan la morfología característica, se observa patrón vascular prominente pre-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>.*

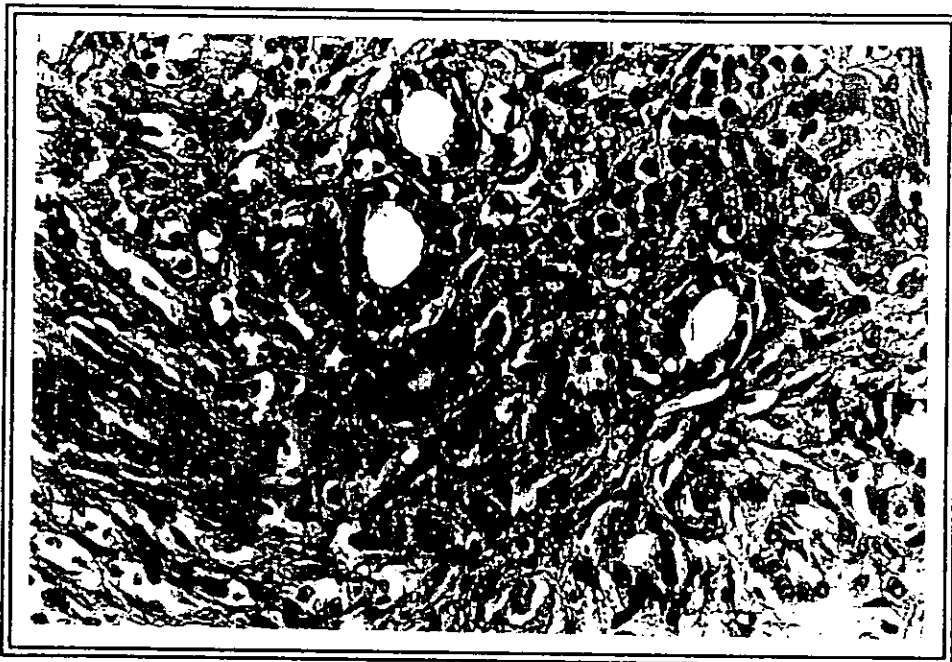


Figura 12. Imagen a mayor aumento de la figura 13 con espacios vasculares perianaxiales claramente visibles pre-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup> (H&E 800X).



Figura 13. Sarcoma de Kaposi post- tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>, se observa un estroma edematoso laxo, con escasas estructuras vasculares HE 600X.





Figura 14. Estroma edematoso laxo de sarcoma de kaposi post-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup> con escasa densidad vascular y vasos del tamaño de capilares (H&E 800X).



Figura 15. Sarcoma de Kaposi post-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup>, se observa un estroma edematoso laxo, con escasas estructuras vasculares HE 600X.

## VI. DISCUSION.

Actualmente, todavía no se dispone de un tratamiento médico que resuelva en su totalidad las lesiones de sk, debido a la serie de factores que se encuentran implicados en la etiopatogenia de esta enfermedad, por lo tanto, los tratamientos están enfocados a controlar la producción de nuevas lesiones y la enfermedad rápidamente progresiva, así como el edema y la afectación pulmonar; a resolver problemas de tipo estético, lesiones dolorosas. Debido a estas deficiencias, se están investigando una serie de tratamientos que incluyen fármacos, citocinas, proteínas u otros compuestos entre las que se puede mencionar la IL-4 que inhibe el crecimiento de la células sk y disminuye la expresión de IL-6 y oncostatina-M, los retinoides que pueden inhibir la expresión de algunas citocinas (IL-6), el polisulfato de pentosán, el polisacárido sulfatado péptido glicán (SP-PG) y el factor 4 plaquetario recombinante, éstos tres últimos con actividad inhibitoria de la angiogénesis. También se están realizando ensayos clínicos con linfocitos citotóxicos e infusión de IL-2 (Ingeber, D., et. al., 1990; Kanh, J., et. al., 1993; Klimas, N., 1993). Por lo tanto el Fibroquel<sup>MR</sup>, mezcla de colágena tipo I y PVP, no es el único fármaco con tales características, que se ha probado en el tratamiento del sk. En años anteriores se aceptaba que la colágena no tenía ninguna función específica y que solamente era una proteína que daba soporte al organismo, sin embargo, actualmente se está probando en el tratamiento de artritis reumatoide (Trentham, D.E., et. al., 1993; Baringa, M., 1993) por lo que no es de sorprender que el Fibroquel<sup>MR</sup> y otros fármacos relacionados estén siendo utilizados en el tratamiento de patologías para las cuáles aún no se ha encontrado un tratamiento definitivo.

Para evaluar los efectos del Fibroquel<sup>MR</sup> en el sk asociado a SIDA se realizaron experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* que permitieron establecer que este fármaco es capaz de inducir modificaciones en esta patología

Para realizar los ensayos *in vivo* se seleccionaron tres pacientes con sk en los que primero se confirmó la presencia de anticuerpos anti-VIH. Los tres pacientes presentaron un patrón completo de anticuerpos anti-VIH y con esto se aseguró que el sk que se trataría con el fármaco estuviera asociado a SIDA.

Antes y después del tratamiento con el fármaco, se midió la expresión de receptores de superficie en los pacientes con sk y los controles. Los controles seleccionados fueron personas VIH negativas, esto debido a las variaciones en los pacientes con sk-SIDA que ya han sido reportadas y que pueden ser explicadas por la infección con el VIH. Estas variaciones pueden ser resumidas en defectos inmunológicos

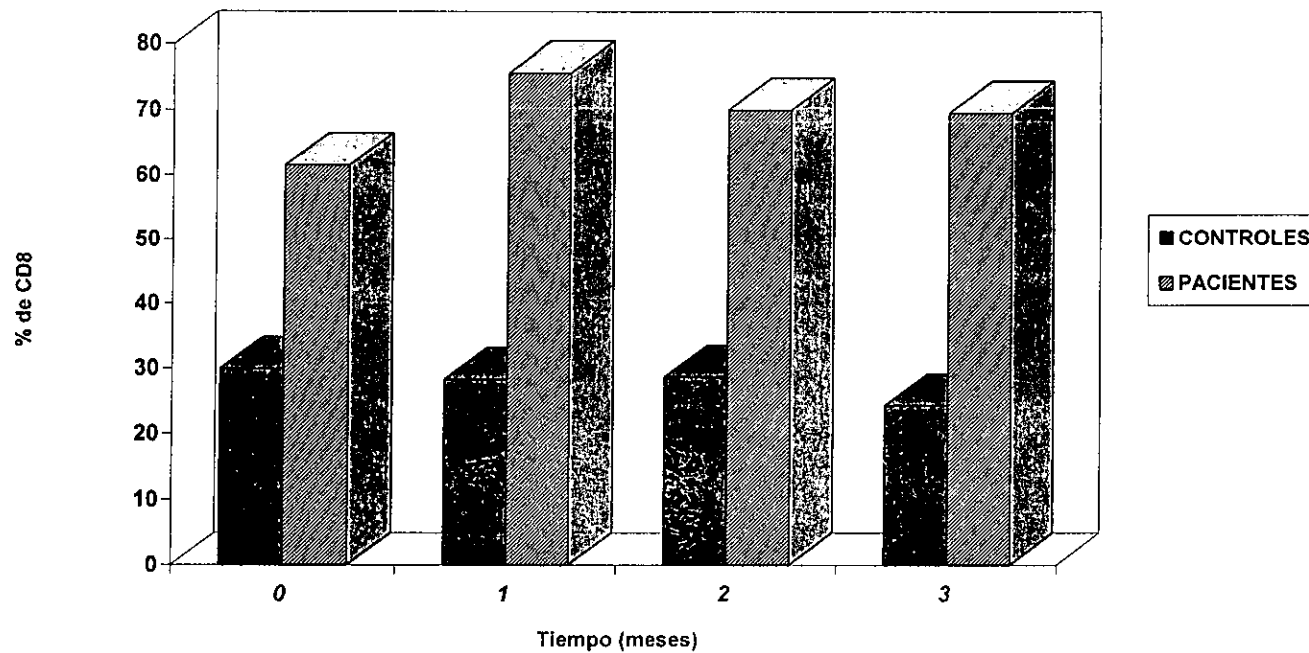
caracterizados por anomalías como son: disminución de las células CD4+ y aumento de las células T CD8+, activación de las células B y pobre respuesta antigénica específica, así como también malignidades de las células B, defectos humorales y celulares originados por las células asesinas y alteraciones en los macrófagos en los que se presenta disminución de la quimiotaxis y de la fagocitosis. Estas alteraciones ocasionan la falla de la inmunidad citotóxica ante el establecimiento de tumores (Bollinger, R.C. and Siliciano, R.F., 1992 y Schroff, R.W., 1983). También existen diferencias en las variaciones de carácter inmunológico entre pacientes debidas a las infecciones oportunistas. Por todo lo anterior, era difícil establecer si el Fibroquel<sup>MR</sup> producía alteraciones a este nivel en el grupo tratado y aunque no se esperaba ningún tipo de alteración en estos parámetros, se incluyeron personas sanas tratadas como controles y no a otros pacientes con sk no tratados.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas (Tabla 1) en los valores de CD8+ y CD14+. Sin embargo, la diferencia en el CD8+ está dada, tanto en los controles como en los pacientes, con base en las variaciones entre los constituyentes de cada uno de los grupos y se mantiene dentro de los valores de referencia de CD8+ que van de 11 a 38 % (Figura 16).

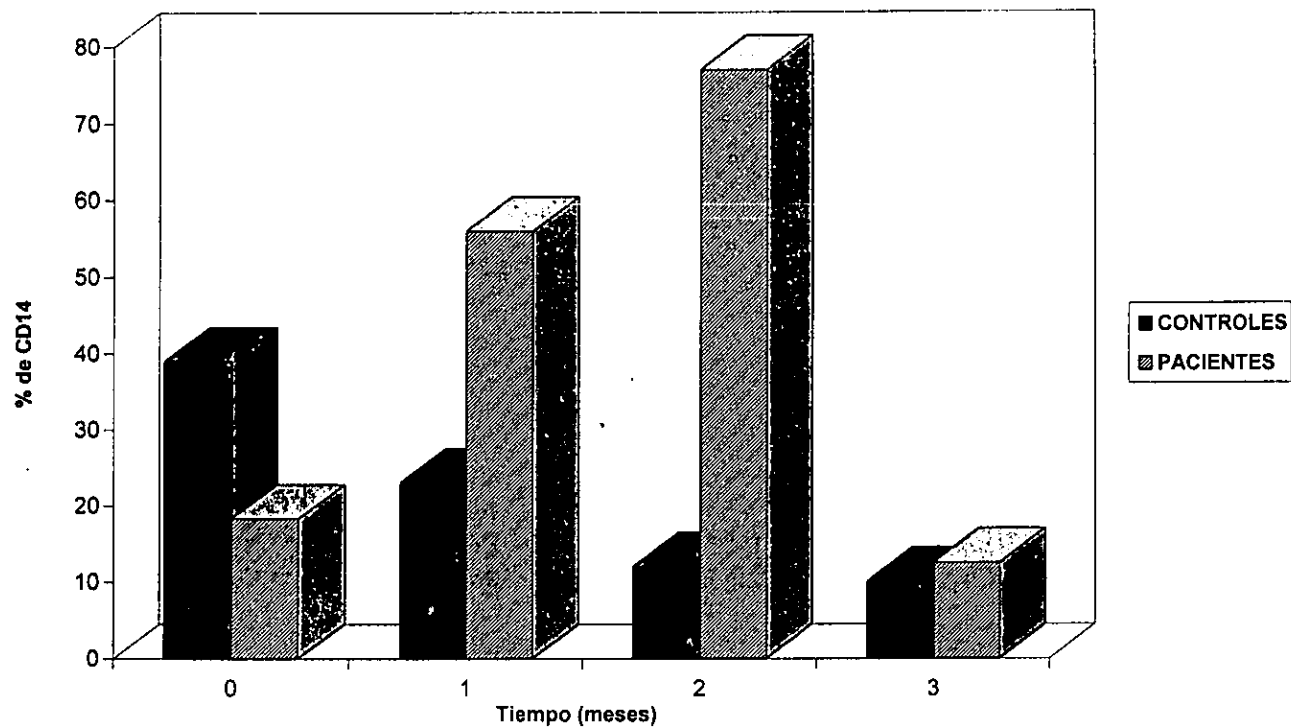
En lo que respecta al CD14 se observó una diferencia significativa debida al tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup> (Figura 17), observándose una disminución de este marcador en los controles y aumento en los pacientes. En lo que respecta al CD14+ se puede observar en la figura 17, que en los controles, hay una constante disminución del % de este parámetro casi al 50% en el primer mes de tratamiento e igualmente del primero al segundo mes, manteniéndose así hasta el tercer mes, de seguimiento, en tanto que en los pacientes se presentó un constante aumento de este valor que disminuyó llegando a niveles normales al tercer mes, de seguimiento. Se desconoce el mecanismo por el cual el Fibroquel<sup>MR</sup> puede modificar la producción del TNF $\alpha$ , la IL-1, el TGB $\beta$  y el PDGF. Sin embargo, se sabe que el CD14 es una glicoproteína que se encuentra anclada al glicosil fosfatidil inositol y está distribuida en monocitos, macrófagos, neutrófilos, algunas células B y células dendríticas y es un receptor para el lipopolisacárido que puede transducir señales conllevando a estallido respiratorio y a la síntesis del TNF $\alpha$  y este receptor podría tener alguna significancia en la producción de señales que estimulen a las células T aloreactivas y en el proceso de fagocitosis (Williams, J.W, 1995).

Se desconoce el valor de referencia de este parámetro por lo que no se puede establecer si este aumento o disminución es importante a nivel funcional, sin embargo,

Figura 16. Variación del % de CD8 en los controles y pacientes tratados con Fibroquel MR



*Figura 17. Variación del % de CD14 en los controles y en los pacientes tratados con Fibroquel MR*



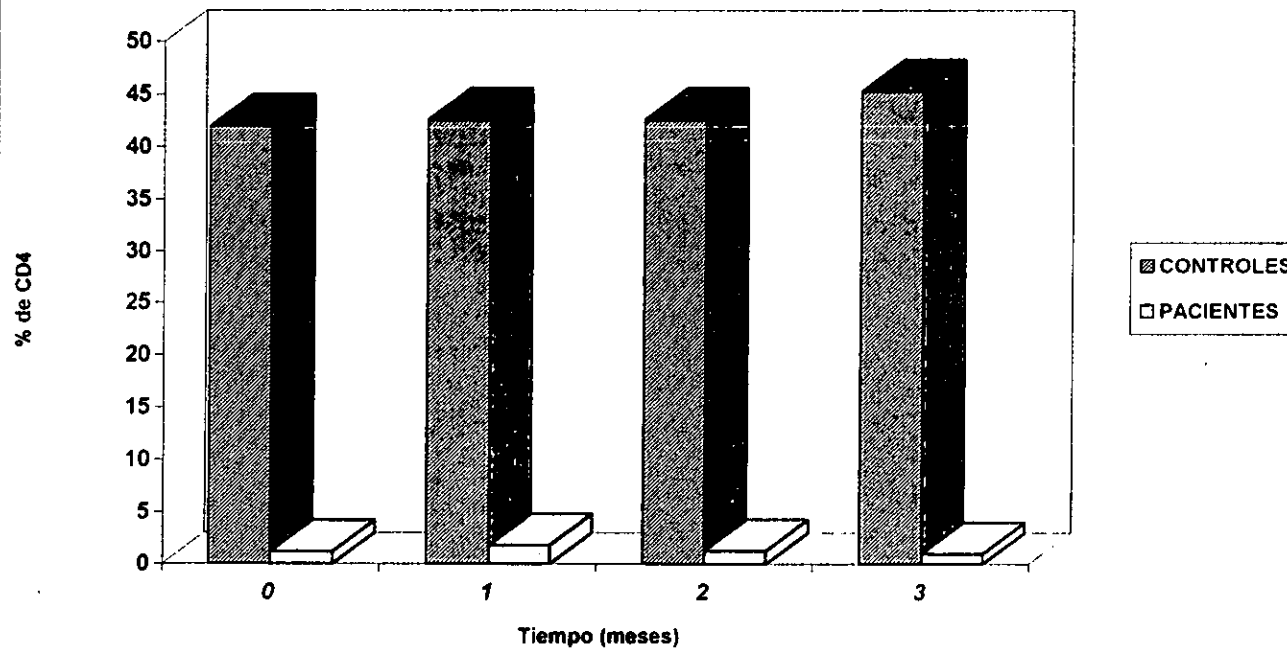
podría ser uno de los mecanismos por los cuáles el Fibroquel<sup>MR</sup> induce la disminución del  $TNF\alpha$ .

En los valores de  $CD4+$  se observaron diferencias significativas sólo en los pacientes, sin embargo estas diferencias son debidas a las variaciones que hay entre los constituyentes del grupo y no al tratamiento con el fármaco (Tabla 1). Los  $CD4+$  en los pacientes, se encuentran significativamente disminuidos con respecto a los controles, característica principal de los infectados con el VIH (Figura 18).

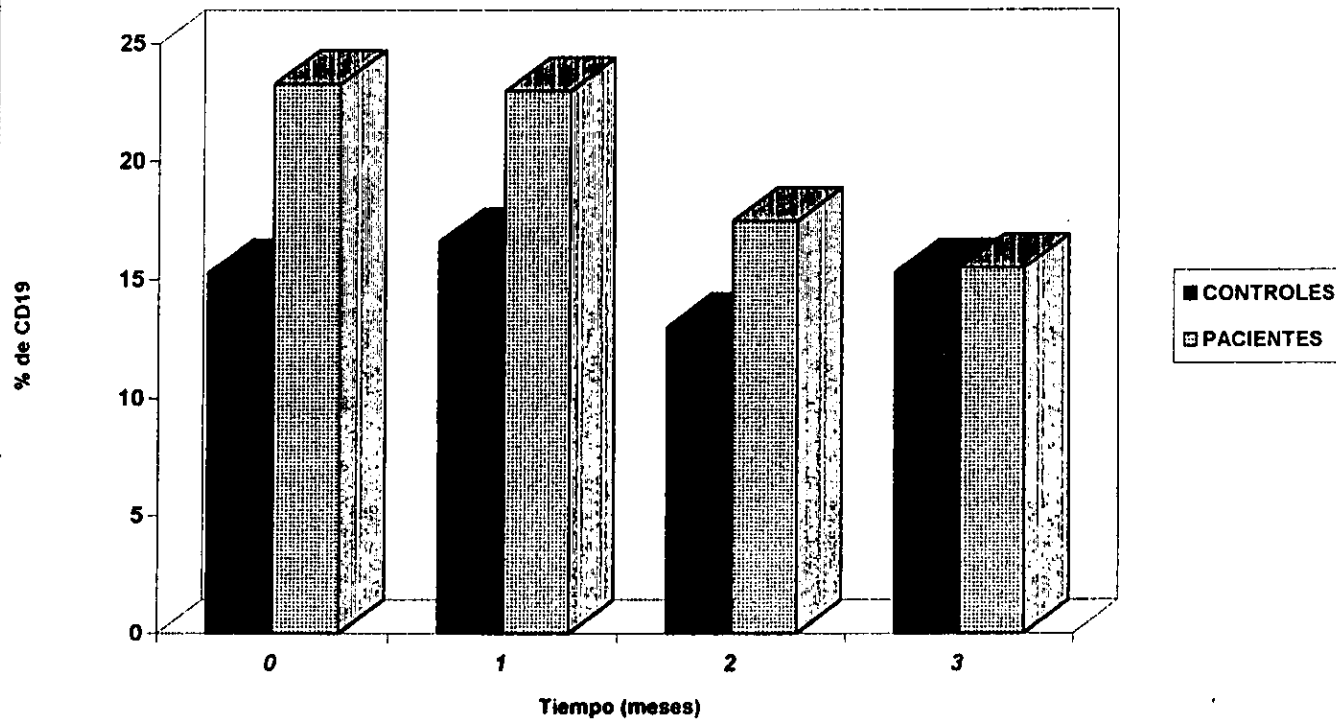
También se observó una diferencia significativa en los valores del  $CD19$ , pero estas variaciones, igual que en el  $CD4+$  se deben a las diferencias entre pacientes (Figura 19).

Por otra parte, y refiriéndose a los resultados histopatológicos de las biopsias de los pacientes al tiempo cero y al mes de tratamiento, algunas citocinas inflamatorias tales como la  $IL-1\beta$ , el  $TNF\alpha$ , y el INF estimulan el crecimiento de las células sk y estas células producen altos niveles de FGFb que median de una manera autócrina y parácrina el crecimiento de las células endoteliales y la angiogénesis. En las biopsias post-tratamiento con Fibroquel<sup>MR</sup> se observó disminución de las estructuras vasculares y de las células fusiformes, cambios que probablemente se están dando debido a la capacidad del Fibroquel<sup>MR</sup> de modificar la  $IL-1$  y  $TNF$  (Datos no publicados) necesarios para estimular el crecimiento de las células sk. En lo que respecta al VIH la proteína tat potencia la actividad del FGFb, induciendo la angiogénesis y la inflamación de la lesión de sk debido a que la región RGD de tat que se une a las integrinas  $\alpha5\beta1$  y  $\alpha v\beta3$  media la migración e invasión de las células de sk y provee a las células de una señal requerida para el crecimiento de éstas, en respuesta a un estímulo angiogénico. El  $TGF\beta1$  puede inducir la expresión elevada de la integrina  $\alpha5\beta1$  e incrementar su función adhesiva en el fenotipo  $CD8+$  activado por anti- $CD3+$ . Ha sido propuesto que el  $TGF\beta1$  podría inducir el crecimiento indirectamente por la regulación de otros factores de crecimiento o sus receptores, o por el control de moléculas de adhesión que pueden también promover el crecimiento celular.  $TGF\beta1$  regula la expresión de varios receptores de adhesión incluyendo integrinas  $\beta1$  y  $\beta2$  y algunos de sus ligandos incluyendo proteínas de matriz extracelular como la fibronectina y la colágena. Los estudios con células no linfoides indican que los eventos de señalización dados por factores de crecimiento y adhesión también contribuyen al perfil de crecimiento celular al proveer protección a las células de la apoptosis (Rich, S. et. al., 1996). Ya que el  $TGF\beta1$  incrementa la expresión de la integrina  $\alpha5\beta1$  con la cual interacciona tat para promover la angiogénesis, es posible que la disminución de estructuras vasculares en la biopsias de sk tratadas con Fibroquel<sup>MR</sup> se

**Figura 18. Porcentaje de CD4 en los controles y pacientes tratados con Fibroquel MR**



*Figura 19. Porcentaje de CD19 en los controles y pacientes tratados con Fibroquel MR*





deba a que, este fármaco induce la disminución de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, TGF $\beta$ 1 e integrinas que están estimulando el proceso de angiogénesis.

Las modificaciones producidas por el Fibroquel<sup>MR</sup> también pudieron ser observadas a nivel macroscópico ya que las lesiones tratadas presentaron aclaración con la aplicación del fármaco observandose rosadas o blancas como se muestra en las figuras 5,6,7 y 8. La pigmentación de las lesiones es causada por una alta densidad de capilares y por los depósitos de hierro intracutáneo (Boger, R.J., et. al., 1993). Probablemente el cambio de coloración a la aplicación de Fibroquel<sup>MR</sup> esté dado por la remodelación del tejido generada por la disminución de citocinas que influyen en la exacerbación del tumor, estimulando a las células fusiformes y a la producción de estructuras vasculares, sin embargo, esto no ha sido probado.

Los exámenes de laboratorio de química sanguínea y biometría hemática (Tablas 2 y 3), tanto de los pacientes como de los controles, antes y durante el tiempo de tratamiento, permitieron establecer que el fármaco no es tóxico, y estos resultados eran de esperarse debido a la naturaleza del Fibroquel<sup>MR</sup>.

En lo que se refiere a los experimentos *in vitro*, con el objeto de establecer si las modificaciones de las lesiones de sk en los pacientes se estaban dando por muerte celular debida al pH 4 del Fibroquel<sup>MR</sup>, éste se adicionó, en diferentes porcentajes, a cultivos de células Hut 78, HeLa-CD4+ y KS4. Se observó que la línea KS4 presentó mayor sensibilidad al fármaco con respecto a las otras líneas, sin embargo, se sugiere que la resolución de la lesión podría deberse probablemente a un efecto sinérgico entre la muerte de las células sk y la modificación de citocinas.

Finalmente se probó si el Fibroquel<sup>MR</sup> a dosis no tóxicas podría inhibir la replicación viral del VIH en la línea Hut-78 infectada con el virus III-b, si así se hubiera dado, se podría sugerir que el proceso angiogénico no sólo disminuiría por las modificaciones en las citocinas antes mencionadas, sino también por disminución del VIH y a su vez de la proteína tat que participa directamente en la generación de la angiogénesis. La posibilidad de que el fármaco inhibiera la infección del VIH era casi nula, sin embargo, basados en que el Fibroquel<sup>MR</sup> está constituido por colágena y el CD26 (Torimoto, Y., et. al., 1992), correceptor para la entrada del VIH a los linfocitos, tiene el epitópo Ta1 que sirve para la unión de la colágena cuando se da la activación de las células T (Gijs, A., et. al., 1991), y es el punto de unión del asa V3 de la glicoproteína gp120 del VIH, entonces al competir por el receptor tanto la colágena como el VIH, se induciría la disminución de virus. Sin embargo, en la figura 2 se puede observar que la cantidad de antígeno p24 no varía con respecto al control por lo que se sugiere que el

fármaco no inhibe la replicación del VIH-1 lo cuál coincide con los reportes hechos por otros investigadores, que han probado que incluso aunque haya deficiencia del CD26 el VIH puede entrar a la célula mediante otros mecanismos.

Aunque mediante el uso del Fibroquel<sup>MR</sup>, se pueda modificar el balance de citocinas y así disminuir el proceso angiogénico, no hay que olvidar que uno de los factores etiológicos considerados en la generación del sk y quizá el que actualmente se acepta más ampliamente, es el HHV-8, virus del tipo herpes que podría estar contribuyendo en la formación de la lesión. Como aún no está clara la etiopatogenia del sk, es necesario ampliar las investigaciones en el uso de terapias combinadas que estén encaminadas a atacar no solo algunos de los factores etiológicos hasta ahora considerados, ya que como en el caso del HHV-8, aunque el Fibroquel<sup>MR</sup> puedan inducir una disminución significativa de citocinas, tal vez con ésta acción no podrá ser anulada la participación del HHV-8.

## VII. CONCLUSIONES.

- El Fibroquel<sup>MR</sup> es capaz de inducir modificaciones en el sarcoma de kaposi tanto *in vivo* como *in vitro*.
- El Fibroquel<sup>MR</sup> resultó ser tóxico en un 50 % para las células SK4 a dosis no tóxicas para las células HeLa-CD4+ y Hut -78.
- El Fibroquel<sup>MR</sup> no afectó la replicación viral del VIH-1 en las células Hut - 78.
- El Fibroquel<sup>MR</sup> no resolvió las lesiones de sarcoma de kaposi en los pacientes tratados, sin embargo indujo el cambio de coloración, la descamación y la disminución de vasos sanguíneos.
- Las lesiones tratadas con Fibroquel<sup>MR</sup> presentaron escasa densidad vascular y vasos del tamaño de capilares.
- El Fibroquel<sup>MR</sup> disminuyó los niveles de expresión de la molécula CD14 en los monocitos de los controles sanos.
- El Fibroquel<sup>MR</sup> no causó efectos hepatotóxicos en los individuos tratados.

## VIII. BIBLIOGRAFIA.

Ambroziak JA, Blackburn DJ, Herndier BG. Herpes like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients: *Science* 1995; 268: 582-583.

Bagasra Omar, Bobroski Lisa, Bagara U, Alexander, Saikumari Pamujula, Wood Charles, Sosa Carlos and Pomerantz J. Roger. Localization of HHV-8 in Kaposi's Sarcoma Lesions. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Barbara Ensoli. Vascular Integrins in Kaposi's Sarcoma Pathogenesis. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Barillari G, Buonaguro L, Fiorelli V, Hoffman J, Michaels F, Gallo, RC, Ensoli B: Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV-1 gene expression. *J Immunol* 1992; 149:3727-3734.

Barillari G, Hoffman J, Bounaguro L. Cytokines released by activated primary T cells stimulate growth of AIDS-KS derived cells and other cells of mesenchymal derivation. FHRRT. Bethesda, MD. 11-17 August,

Baringa, m. Treating Arthritis With Tolerance. *Science* 1993, 261: 1669-1670.

Bejcek BE, Hoffman RM, Lipps D, Li DY, Mitchell CA, Majeurs PW, Deuel TF: The v-sisonco-gene product but not PDGF-A homodimers activate PDGF a y b receptors intracellularly and initiate cellular transformation. *J Biol Chem* 1992;267:3289-3293.

Beral V, Bull D, Darby S. Risk of Kaposi's Sarcoma and sexual practices associated with fecal contact in homosexual or bisexual men with AIDS. *Lancet* 1992;339:632-635.

Berson AM, Quivey JM, Harris JW, Wara WM. Radiation therapy for AIDS-relates Ksaposi's sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 19: 569-575.

Bollinger, RC. and Siliciano, RF. (1992). Immunodeficiency in HIV-1 infection. In: AIDS and Other Manifestations of HIV. 2a. Edición, Ed. Raven Press; 146.

Bogner, R.J., Zitz, C., Held, M., Spathling, S., Sandor, P., Kronawitter, U. and Goebel, F. Ultrasound as a tool to evaluate remission of cutaneous Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1993, 7:1081-1085.

Bos J.D. and Kapsenberg, L.M. (1993). The skin immune sysyem:progress cutaneous biology. *Immunology Today* 14:(2), 75-78.

Bruce E. Vogel, Shu-Jan Lee, Axel Hildebrand, William Craig, Michael D. Pieeerschbacher, Flossie Wong-Staal, and Erkki Ruoslahti. (1993). A Novel Integrin Specificity Exemplified by Binding of the avb5 Integrin to the Basic Domain of the HIV Tat Protein and Vitronectin. *The Journal of Cell Biology*, 121:461-468.

Buonaguro L, Barillari G, Chang HK, Bohan CA, Morgan RA, Kao U, Gallo RC, Ensoli B: Effects of HIV Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol* 1992;11:217-223.

Carriedo C, Rubio R, Moreno S. Kaposi's sarcoma associated with AIDS Analysis of predictive factors for survival. IX International Conference on AIDS. Berlin 1993; 1:399 (PO-B12-1586)

Cesarman E, Chang Y, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based-lymphomas. *N Engl J Med* 1995;332:1186-1191.

Cohen J. Controversy: Is KS really caused by new herpesvirus? *Research News. Science* 1995;268:1847-1848.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865-1869.

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

49

Charles R. Mackay and Beat A. Imhof (1993). Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today* 14:3:99-102.

Chiu IM, Reddy P, Givol D, Robbins KC, Tronick SR, Aaronson SA. Nucleotide sequence analysis identifies the human c-sis proto-oncogene as a structural gene for platelet-derived growth factor. *Cell* 1984;37:123-129.

De Wit R, Schattenkerk JK, Boucher CA, Bakker PJ, Venhof KM, Danner SA. Clinical and virological effects of high-dose recombinant interferon-alpha in disseminated AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1988; 2: 1214-1217.

Delli Bovi P, Donti E, Knowies DM, Friedman\_Kien A, Luciw PA, Dina D, Dalla-Favera R, Basilico C. Presence of chromosomal abnormalities and lack from retrovirus-infected CD4+ T cells. *Science* 1988;242:426-430.

Díaz de León, L., Kröttsch, G.E., Guerrero-Padilla, E., Cervantes-Viramontes, R., Reyes-Márquez, R. y Ruiz-Lozano, M.C. 1994. expectativas en el Tratamiento de la Fibrosis Tisular de Etiología Diversa. 11º Congreso Latinoamericano de Genética y 3º de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Puerto Vallarta, Jal. México. 492.

Dupin N., Grandadam M., Calvez V., Gorin I., Deleuze J., Harvard S., Mungnier P., Agut H., Huraux JM. and Escande J-P. Detection of herpesvirus DNA sequences in patients with mediterranean Kaposi's Sarcoma and Castelman disease. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Ensoli B, Gendelman R, Markham P. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of kaposi's sarcoma. *Nature (Lond)* 1994;371:674-680.

Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature (Lond)* 1990;345:84-88.

Ensoli, B., Nakamura, S., Salahuddin, Z.S, Biberfeld, P, Larsson, L, Beaver, B., Wong-Staal, F., Gallo, C. R. (1989). AIDS-Kaposi's Sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects. *Science* 1989;243: 223-226.

Furazawa-Carballeda, J.G. (1996). *Wound Repair and Regeneration* 4:(1), Boston Massachusetts.

Gallo R, Nerurkar V. Human retrovirus: their role in neoplasia and Immunodeficiency. *Annals N.Y. Acad Science* 1989;567:82-94.

Gallo RC. AIDS and related malignancies. En: Rossi GB, Beth-Giraldo E, Chiecco-Bianchi L, Dianzini F, Giraldo G, Verani P. *Science Challenging AIDS*. Basilea:Karger, 1992;116-125.

Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ. The IL-6 signal transducer, gp130: An Oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992;255:1434-1437.

Gijs A. van Severen, Yoji Shimizu and Stephen Shaw. Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation. *Current Opinion in Immunology* 1991, 3: 294-303.

Gill PS: Pathogenesis of AIDS related malignancies. *Curr Opin Oncol* 1991; 3:867-871.

Giovanni Barillari, Rita Gendelman, Robert C. Gallo, and Barbara Ensoli. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 199, 90:7941-7945.

Giraldo G, Beth E, Coeur P. Kaposi's Sarcoma : a new model in the search for viruses associated with human malignancies. *J Natl Cancer Inst* 1972; 49:1495-1507.

Giraldo G, Beth E, Kourilsky FM. Antibody patterns to herpes viruses in Kaposi's Sarcoma: serologic association of European Kaposi's Sarcoma with cytomegalovirus. *Int J Cancer* 1975; 15:839-848.

Giraldo, G, Salvatore, M, Chiecco-Bianchi, L., Beth Giraldo, E. *Advanced Technologies in Research, Diagnosis and Treatment of AIDS and in Oncology*. Antibiot and Chemoter. Basel, Karger, 1994, vol 46, p.p. 73-87.

Harris PJ. Treatment of Kaposi's sarcoma and other manifestations of Aids with human chorionic gonadotropin. *Lancet* 1995;346:118-119.

Hernández, P.N. Tratamiento de la contractura del tendón de aquiles en pacientes con parálisis cerebral infantil con aplicación de colágeno polimerizado al 1% asociado a ejercicio terapéutico. Memorias de las Jornadas Nacionales de Médicos Residentes del IMSS. México 1992.

Huang, Q.Y.; Li, J.J.; Kim, S.K.; Nicolaidis, A. Zhang, G.W.; Poiesz, J. Bernard and Friedman-Kien, E. A. (1993). HIV-1 infection and modulation of cytokine and growth factor expression in Kaposi's sarcoma-derived cells *in vitro*. *AIDS* 7:317-322.

Humphrey RW, O'Brien TR, Newcomb FM, Nishihara H, Saville NW, Straus SE, Yarchoan R. Persistence of KSHV/HHV-8 sequences in the peripheral blood 16 mononuclear cells (PBMC) of patients with AIDS-Kaposi's sarcoma (AIDS-KS) receiving anti-herpes drugs. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Ingeber D, Fijita T, Kishimoto S. Synthetic analogues of Fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990; 348 :555- 557.

John A. Hamilton (1993). Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages-some controversies. *Immunology Today* 14:1:18-24.

Kahn, et. al. Cap 11 :AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma P.p. 261-281-

Kanh J, Ruiz R, Kerschmann R, A phase ½ study of recombinant platelet factor (rPF4) in patients with AIDS related Kaposi's sarcoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12:50.

Kaplan LD, Kahn J. Therapy for HIV-associated Kaposi's sarcoma . *Semin Oncol* 1989;14:19-22.

Klimas N, Fletcher M, Walling J, Pardo V, Okema T, Kremer J. Response of Kaposi's Sarcoma to Autologous CD8 Cells Expanded and Activated Ex Vivo and Reinfused With rIL-2. IX International Conference on AIDS 1993; 1: 58.

Kröttsch- Gómez F. E., Reyes- Márquez R., and Díaz de León, L. TGFβ and PDGF-AB Expression in Fibroblasts Derived From Normal Skin, Hypertrophic/Keloid Scar and Hypertrophic/Keloid Scar Treated with Fibroquel<sup>MR</sup> (1996). *Wound Repair and Regeneration* 4;(1) A160, Boston Massachusetts.

Kröttsch, G.E. Efecto del FibroquelMR Sobre el Metabolismo de la Colágena en Cultivos Celulares de Fibroblastos y Macrófagos de Rata. Tesis de Maestría. I.I.B., UNAM, 1995.

Kröttsch, G.F., Guerrero-Padilla, E., Díaz de León, H.L. 1993. Morphological studies on the effects of fibroquel during wound healing of surgical wounds in rats (Abstract). *J. Cell. Biochem. (suppl 17E):*137.

Ksinskovic JG: Kaposi's sarcoma :It's "oncogenes" and growth factors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1991;11:87-107.

Leal f, Williams LT, Robbins KC, Tronick SR, Aaronson SA: Evidence that the v-sis gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. *Science* 1985;230:327-330.

Lefrere J.J., Meyohas, M.C., Mariotti M., Meynard J.L., Lerable J., Frottier J. Detection of HHV-8 during the whole incubation period of AIDS 14 before the appearance of Kaposi's sarcoma in HIV-positive individuals with a known date of HIV infection. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Levy JA. A new human herpesvirus: KSHV or HHV8? *Lancet* 1995;346:7786.

Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Zeman RA. Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a human pregnancy hormone. *Nature (Lond)* 1995;375:64-68.

Miles Sa, Martínez-Maza O, Rezai A. Oncostatin M as a potent mitogen for AIDS-Kaposi's sarcoma derived cells. *Science* 1992;255:1432-1434.

Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *n Engl J Med* 1995;332:1227-1228.

Moore SP. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV/HHV8). 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Moore, P.S. (1997). Potential mechanisms for cellular transformation by KSHV. 4a. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract-On-Disk®.

Nadji, M.; Morales, A. Ziegles-Weissman, J.; Penneys, N. (1981). Kaposi's sarcoma: immunohistologic evidence for an endothelial origin. *Arch Pathol Lab Med* 105: 274-275.

Nair BCh, De Vico AL, Nakamura S. Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells on Oncostatin M. *Science* 1992;255:1430-1432.

Nakamura, S., Salahudin, Z.S., Biberfeld, P., Ensoli, B., Phillip, D. M., Wong-Staal, F., Gallo, C. R. Kaposi's sarcoma cells: long term culture with growth factor from retrovirus-infected CD4+ T cells. *Science* 1988;242: 426-433.

Parkash S. Gill, M.D. Hormones in the Pathogenesis and Treatment of KS. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Parravivini C, Capra M, Bestetti G, Aubin JT, Bifulco C, Berti E, Picozza E, Katz E, Briere J, Gessain A, Galli M, Agut H and Corbellino M. In Situ detection of human herpesvirus-8 DNA 15 sequences in AIDS-associated Kaposi's Sarcoma. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.

Rich, S., Nood, V.N. and Lee, Hon-Man. Role of  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin in TGF $\beta$ 1- Costimulated CD8+ T cell growth and apoptosis. *J. of Immunology*, 1996, 157: 2916-2923.

Roizman B. New viral footprints in Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 1995;332: 1227-1228.

Roth WK, Wernwr CG, Schirren S, Wernwr CG: Depletion of PDGF from serum inhibits growth of AIDS-related and sporadic Kaposi's sarcoma cells in culture. *Oncogene* 1989;4:483-487.

Roth WK: HIV-associated Kaposi's sarcoma: New developments in epidemiology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991;117:186-191.

Safai B, Schwartz JJ. Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and prevention (3rd de.). Philadelphia: JB Lippicott Company, 1992; 209-223

Safai B, Johnson KG, Myskowski PL, Koziner B, Yang SY, Winningkam-Rudies S, Godbold JH, Dupont B: The natural history of Kaposi's sarcoma in acquired immune syndrome. *Ann Intern Med* 1985; 744-750.

Schalling M, Ekman M, Kaaya EE. A role for a new herpes virus (KSHV) in diferent forms of Kaposi's sarcoma. *Nature Med* 1995;1(7):707-708.

Schofer H, Ochsendorf F, Hochscheid Y, Milbradt R, Facial Kaposi's sarcoma: evaluation of different palliative treatment modalities. VII International Conference on AIDS. Florence, Italy, June 16-21, 1991; vol 1: 243 (abstract MB 2247).

Schroff, WR; Gottlieb, MS; Prince, HE; Chai, LL; and Fahey JL. (1983). Immunological Studies of Homosexual Men with Immunodeficiency and Kaposi's Sarcoma. *Clinical Immunology and Immunopathology* 27, 300-314.

Schultz TF, Weiss R, Kaposi's sarcoma. A finger on the culprit. *Nature (Lond)* 1995;373:17-18.

SIDA/ETS Vol. 6, N. 1, 1992. INDRE 2095.

SIDA/ETS Vol. 6, N. 3, 1992. INDRE 2137.

- Siddiqui A. Hepatitis B virus DNA in Kaposi's Sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4861-4864.
- Sidky TA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 1987; 47:5155-5161.
- Stürzl M, Roth W, Brockmeyer NH, Zietz C, Speiser B, Hofshneider PH.; Expression of platelet-derived growth factor and its receptor in AIDS-related Kaposi sarcoma in vivo suggests paracrine and autocrine mechanisms of tumor maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7046-7050.
- Tappero JW, Berger TG, Kaplan LD, Volberding PA, Kahn JO. Cryotherapy for cutaneous Kaposi's sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): a phase II trial. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4:839-846.
- Templeton, A.C. In: *Principles of Internal Medicine*. Mc Graw Hill 12a. Edición 1991, 1183-1225.
- Torimoto, Y.; Dang, H.N.; Tanaka; T. Prado, C. Schlossman, F.S. and Morimoto, C. Biochemical Characterization of CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV): Functional Comparison of Distinct Epitopes Recognized By Various Anti-CD26 Monoclonal Antibodies. *Molecular Immunology* 1992, 29: 183-192.
- Travis J. Kaposi's Sarcoma gives on key fronts. *Research News Science* 1992; 255: 1352-1354.
- Trentham, D. E.; Trentham, D. A.; Orav, J. K.; Combitchi, D.; Lorenzo, C.; Sewell, L.K.; Hafler, A.D.; Weiner, H.L. Effects of Oral Administration of Type II Collagen on Rheumatoid Arthritis *Science* 1993, 261: 1727-1730.
- Vogel J, Hinrichs SH, Reynolds RK, Luciw PA, Jay G. The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 1988;335:606.
- Walker RE, Lane HC. Interferon alfa in HIV infection. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and prevention (3rd de.). Philadelphia: JB Lippicott Company, 1992; 395-406.
- Weiss A.R. Perspectives on HHV8 and Kaposi's Sarcoma. 3rd Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Washington DC, 1996. Abstracts-On-Disk®.
- Wernwr CG, Wernwr CG, Heidin CH, østman A, Roth WK.; Cultured Kaposi's sarcoma derived cells express functional PDGF a-type and B-type receptors. *Exp Cell Res* 1990;187:98-103.
- Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M. Detection of kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;346:799-802.
- Wilson Savino, Dea Maria S. Villa-Verde and Joeli Lannes-Vieira (1993). Extracellular matrix proteins in intrathymic T cell migration and differentiation? *Immunology Today* 14: 158-160.
- Williams, J.W. (1995). *Hematology*. Editorial Mc Graw Hill Inc. New York 5a. Edición, Vol.1, 116,117,252-256,861-868.