



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Medicina Preventiva
y Salud Pública**

**ASOCIACIÓN ENTRE Hsp70 Y
ESTADO VIROINMUNOLÓGICO
EN PACIENTES VIH+**

Tesis Doctoral

Elena Espigares Rodríguez

Granada, 2005

ASOCIACIÓN ENTRE Hsp70 Y ESTADO VIROINMUNOLÓGICO EN PACIENTES VIH+

Tesis Doctoral que presenta ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ
para aspirar al Título de Doctor con mención europea.

Granada, 1 de abril de 2005.

Directores de la Tesis Doctoral

Prof. D. Ramón Gálvez Vargas
Catedrático del Departamento de Medicina Preventiva y
Salud Pública de la Universidad de Granada.

Dr. D. José Hernández Quero
Profesor Titular del Departamento de Medicina de la
Universidad de Granada.

Dra. D^a. Aurora Bueno Cavanillas
Profesora Titular del Departamento de Medicina Preventiva y
Salud Pública de la Universidad de Granada.



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA**
Universidad de Granada

RAMÓN GÁLVEZ VARGAS, CATEDRÁTICO DE MEDICINA
PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D^a. ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, sobre el tema *Asociación entre Hsp70 y estado viroinmunológico en pacientes VIH+*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones que la hacen acreedora al Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

En Granada, a 1 de abril de 2005.

Fdo. Ramón Gálvez Vargas



DEPARTAMENTO DE MEDICINA
Universidad de Granada

JOSÉ HERNÁNDEZ QUERO, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D^a. ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, sobre el tema *Asociación entre Hsp70 y estado viroinmunológico en pacientes VIH+*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones que la hacen acreedora al Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

En Granada, a 1 de abril de 2005.

Fdo. José Hernández Quero



**DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA**
Universidad de Granada

AURORA BUENO CAVANILLAS, PROFESORA TITULAR DE
MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta D^a. ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, sobre el tema *Asociación entre Hsp70 y estado viroinmunológico en pacientes VIH+*, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora, en condiciones que la hacen acreedora al Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

En Granada, a 1 de abril de 2005.

Fdo. Aurora Bueno Cavanillas

AGRADECIMIENTOS

Con la gran alegría de llegar a este momento, deseo dejar mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que han hecho posible de esto una realidad:

A mis directores, D. Ramón Gálvez Vargas, por el interés y confianza que ha demostrado siempre en mi, gracias a esto he podido realizar una beca durante 4 años en su Departamento, pudiendo comprobar su inmensa valía como persona y profesional; D^a. Aurora Bueno Cavanillas, por la dedicación y apoyo que me ha brindado, así como la ilusión desde el principio de este trabajo y D. José Hernández Quero, por sus ideas y asesoramiento durante la investigación , así como por permitir obtener todos los datos necesarios de sus pacientes para este estudio.

A D. Federico García, por su valiosa ayuda para disponer de los sueros en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico para este trabajo, y por enseñarme como se realiza una técnica imprescindible en esta tesis, la técnica ELISA. También se merecen este agradecimiento todos los profesionales que trabajan en este servicio por la ayuda prestada cuando la he necesitado con tanto cariño.

A Mariela que tantas horas ha pasado delante del ordenador proporcionándome información de los pacientes que se incluyeron en este estudio.

A D. Juan de Dios Luna, por su gran amabilidad en todo momento, así como por su ayuda desinteresada en la realización del estudio estadístico, haciendo que tantos y tantos datos se convirtieran en lo que hoy es parte principal de esta tesis.

A D. Pablo Lardelli, por todo lo que ha hecho por mi este año: entrenarme para poder impartir clases de epidemiología a los alumnos, tarea nada fácil, debido a los mínimos conocimientos que yo tenía en esta materia; por todas las horas que ha dedicado a mi aprendizaje, por la enorme paciencia que ha tenido conmigo, por el cariño con la que lo ha realizado, así como por el buen humor que siempre tuvo, haciéndome esta tarea mucho más amena. Me siento muy afortunada por haber sido formada por un gran profesional al que considero mi maestro en epidemiología. Espero no haberle defraudado después de haber impartido la materia a los alumnos, tarea de gran responsabilidad. Gracias.

Al Prof. Graham Pockley, por permitirme hacer una estancia en su laboratorio y dejarme participar en su proyecto, por haberme acogido tan cariñosamente en su grupo de trabajo, por confiar en mí en todo momento, por su asesoramiento, consejos, sugerencias e ideas que ha aportado a este trabajo.

Al grupo de trabajo del Prof. Pockley: Dr. Munita Muthana, Laura Slack, Kay Hopkinson, Barbara Fairburn y Shabana Mirza (mis niñas), por enseñarme todo sobre proteínas de estrés, células dendríticas, diferentes técnicas de laboratorio, entre ellas la más importante para este trabajo (ELISA), transplantes de corazón a nuestras little rats... Pero sobre todo, por acogerme como una más desde el primer día, por la paciencia que tuvisteis con mi inglés chapucero, por devolverme la confianza en mi misma, por vuestra amistad, por lo bien que lo pasé en el trabajo y fuera de él, por ser mi pequeña familia y considerarme como parte de vuestras familias; habeis sido lo mejor que me ocurrió cuando no estaba en el mejor momento. Sois geniales.

A D. Miguel Espigares, parte imprescindible de esta tesis, por todo lo que ha hecho por este trabajo desde el comienzo, por tantas horas que le ha quitado a sus hobbies para dedicarlo a mi. Por su ánimo, cuando las cosas no salían como debían, por su apoyo y ayuda, que han sido muy importantes para que esto fuera posible. Nunca me has fallado, eres una gran persona y un gran profesional.

A D^a. Obdulia Moreno por su ayuda, consejos, apoyo y ánimo que tengo el honor de recibir todos los días.

A César Criado, por su disponibilidad para el trabajo siempre que la he necesitado, haciendo posible la realización de una parte de este estudio; por aguantarme todos los días así como por hacerme pasar tantos momentos divertidos.

A D. José Juan Jiménez por el ánimo que siempre me da y por todos los consejos acerca de mi futuro con tanto cariño, así como por transmitirnos sus conocimientos en epidemiología en nuestros seminarios.

Y a el resto de los componentes de este departamento que de una forma u otra han contribuido a que esto sea un hecho: D^a Milagros Fernández-Crehuet, D. José Guillén, D. Miguel García, D. José Antonio Pérez López, D^a Dolores Jurado, M^a Carmen Mercado, Lola Martínez Bellón, Carolina Donate , Carmen Amézcua y Juan Carlos Fernández.. Gracias por el interés que habéis demostrado.

A mis mejores amigas, Cris, Mer y Eva, juntas desde pequeñas, que siempre estáis animándome y soportando mi genio sin rechistar, pero sobre todo por estar ahí cuando más lo necesité.

Pero todo este esfuerzo se lo quiero dedicar a mis padres, Miguel y Elena, porque sin vosotros, sin vuestra ayuda, ánimo, paciencia, amistad y cariño yo no hubiese llegado donde estoy. Gracias por hacer que despertara de una pesadilla que estaba viviendo. Gracias por confiar en mi y permitir que viviera en Sheffield cuando

estaba tan mal, momento que creo fue duro para vosotros, pero que gracias a esta decisión, ¡mirad lo que pasó!, desperté, volví a nacer. Gracias por darme la vida por segunda vez. Estoy superorgullosísima de vosotros, espero que vosotros lo estéis de mí. Creo que no hay nada en el mundo para agradeceros todo lo que habéis echo, sois lo mejorcito.

A mis padres

SUMMARY

In 1962 stress proteins were described the first time by Ritossa, in cells that are exposed to 37° C during 30 minutes, for which reason these proteins were called *heat shock proteins* (Hsp).

After their identification they were grouped in families on the basis of molecular weights. At the same time, specific functions and mechanisms of actions inside the cell were described. Stress proteins are induced under a wide variety of physiological and environmental conditions.

The most important families are: Hsp100, 90, 70, 60 and low molecular weight. Their most important functions involve:

- Protein folding and assembly do not take place spontaneously, but rather are aided by these stress proteins, as if they were *molecular chaperons*. When unfolded and defolded proteins appear, molecular chaperons bind to them until these proteins achieve perfect folding by means of ATP dependent energy.
- These proteins can be transported across membrane of different subcellular localizations.
- Molecular chaperons, induced by stress, are the key to apoptosis regulation and cellular growth. This has a great importance in relation with cancer and protein freedom, causing an induced immune response.
- Stress proteins can cause an immunological response as a consequence of activities inside and outside the cell.

The Hsp70 concentration increases two- or three-fold inside the cell when abnormal conditions prevail within, an increase that is regulated by means of transcription.

The degree of induction depends on the level and duration of stress, so that the increase may either be temporary or permanent. Hsp synthesis reaches the highest concentration 3-5 hours after heat shock and is reduced after 8 hours, although this concentration remains over basal levels for days or even weeks.

Hsp induction must be closely controlled. Its persistence would seriously modify protein homeostasis and functions within the cell. A thorough bibliographic review shows that in infectious and non-infectious pathological processes a response to the stress takes place. While basal levels of Hsp70 are influenced by several factors (such as environmental temperature), there is an overexpression of these proteins among patients as opposed to healthy subjects.

All Hsps, and Hsp70 in particular, are secreted outside of the cell, and can therefore be detected in blood from healthy subjects as well as patients with acute infections. Studies carried out in healthy populations show basal levels to be higher in females than in males. An increased concentration of Hsp in patients has been likewise observed in subjects suffering from traumatism or traumatic damage. Similarly, increased Hsp expression in damaged tissues from the ovary, mammary glands, endometrium and digestive system has been described.

High Hsp70 levels outside the cell can be seen in peripheral vascular disease and vascular renal disease. Pancreatic diseases are also accompanied by an increased concentration of Hsp: an overexpression of Hsp70 occurs in acute pancreatitis induced by sodium arsenite or arginine, depending on doses and the time involved, and high levels are sustained during 24-48 hours.

Infectious pathological processes related with HIV infection are of special interest, because most entail a characteristic decrease in lymphocytes. Certain studies demonstrate that the expression of Hsp70 in lymphocytes from HIV+ patients is 4.5 times higher in these patients than among controls. Nonetheless, the role of stress proteins in AIDS has been studied relatively little to date. It would seem logical to suppose that Hsp70 has an important role in the life cycle of different RNA and DNA viruses.

Briefly, HIV infection progresses until CD4⁺ cell amounts decrease to below 200 cells/ μ L, resulting in a high susceptibility to opportunist diseases or other possibly lethal pathologies. AIDS can be considered representative of the possible complications arising in the context of an immunodeficiency.

The treatment of HIV patients requires antiretroviral therapy to control the progression of the infectious disease as well as therapeutic measures aimed to

prevent, reduce or control opportunistic diseases. At present, the most promising treatment is *High Activity Antiretroviral Therapy* (HAART), which is obtained undetected levels of viral RNA in plasma. However, this therapy does not ensure removal or control of the infection.

The initial hypothesis behind this study was the possible association between levels of Hsp70 and the viroimmunological status of HIV positive patients. Such an association, if revealed, would have important implications for prognosis and therapy.

Therefore, the main objective was to quantify the association between the viroimmunological status of a population of HIV patients with regard to their levels of the stress protein Hsp70. More specifically, the objectives overall can be broken down to:

1. Identify the differences in the levels of Hsp70 in the different groups of HIV positive patients with varying viroimmunological status.
2. Study the relationship of the main biochemical and viroimmunological parameters, patient sex, and antiretroviral treatment with regard to the concentrations of Hsp70.
3. Analyze the temporal variation of the levels of Hsp70 at the points in time just before and just after virological failure.
4. Assess the utility of Hsp70 concentrations as a biomarker of clinical, virological and immunological evolution of the patients.

The work presented here derives from a longitudinal retrospective case study carried out in the Infectious Unit of the Hospital San Cecilio in Granada. Dates were obtained for patients from 1999 until 2002. The period was further divided in two other periods:

- Period of inclusion of patients: from 1 January 1999 until 31 December 2001.
- Follow-up period: from 1 January 1999 until 31 December 2002.

The corresponding populations were:

1. *Population of reference*: all patients diagnosed with HIV infection residing in Granada before 1 January 1999.
2. *Potentially accessible population*: all patients diagnosed with HIV infection who fulfilled the following requirements:
 - Having been admitted to the Infectious Unit during the period of inclusion.
 - Being under control and medical monitoring in this Unit for three years within the monitoring period.
 - Having at least one blood sample in store at the Unit per patient and year of evolution.
 - Having access to an identified clinical history.

This latter population comprises two groups:

- *Viroimmunologically stable patients (VIS)*: During the follow-up period, this group was characterized as showing an undetectable viral load (<50 copies/mL), and was in turn divided into 3 subgroups depending on the count of CD4⁺ lymphocytes in the first determination performed during the period of inclusion:
 - + *Low level of immunity* (VIS CD4⁺<200), made up of the patients with fewer than 200 lymphocytes CD4⁺/mL.
 - + *Medium level* (VIS CD4⁺ 200-500), patients with a level of lymphocytes CD4⁺/mL between 200 and 500.
 - + *High level* (VIS CD4⁺ >500), patients with more than 500 lymphocytes CD4⁺/mL.
- *Patients with documented virological failure*: those patients admitted to the Unit of Infectious Diseases of the Hospital who, at some point in the study, were determined to surpass an undetectable charge and reach a detectable viral charge of > 5000. These patients fulfilled the following requisites: having in the library of the Unit at least four blood samples (two previous to the instant of failure, another during failure, and a forth afterwards); and having an identified and accessible clinical history.

All these data were obtained from the clinical charts of the infectious unit of the Hospital San Cecilio. Using a previously designed protocol (Appendix 1) we gathered information from each of the patients included in the study. Their state at the time of inclusion in the study was divided into 9 categories according to clinical and immunological state (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 and C3).

The Microbiology Service of Hospital San Cecilio provided samples for this study. In addition, blood samples were taken from 20 healthy control subjects (8 male and 12 female) by the Extraction Service of the Blood Bank of Granada. The objective of their inclusion was to have a point of reference about the levels of Hsp70 in healthy subjects.

For the purposes of this study, a two-stage statistical analysis was carried out:

1. For each of the variables analyzed, a descriptive study was done with the most usual standardizing measurements (mean, standard deviation, age, etc.).
2. In order to compare groups of patients, and in view of the type of sampling done, a non-classical methodology was used. In fact, for those patients who had undergone failure, there were four measurements, two of them previous to failure, one at failure, and one following failure. Meanwhile, for the patients not exhibiting failure, there were three measurements, and for the controls just one measurement. Because the means thus obtained are not independent, the common methodology for independent observations could not be applied, and the GEE model method was used. This model (formally similar to multiple linear regression models) allowed us to detect whether the association between each variable and the levels of the protein were significant or not.

For all the cases where necessary, the measure of the protein was corrected in order to achieve homogeneous variances, using the neperian logarithm of the measurement plus one as the most common transformation to stabilize variance.

APPENDIX I**Protocol for obtaining clinical data**

Identification: _____
 Age/Date of birth: _____
 Sex: 1. Male; 2. Female
 Date HIV known: __ / __ / __
 State at time of inclusion (1st visit): ____
 Means of transmission: 1. Sexual; 2. Parenteral drug use; 3. Other
 Patient group:
 1. Virological failure
 2. VIS CD4⁺ <200
 3. VIS CD4⁺ 200-500
 4. VIS CD4⁺ >500

<p>POINT IN TIME 1 Date: __ / __ / __ Viral load: _____ Clinical progression : 1. Yes; 2. No. Specify (if 1): _____ Analytical: Creatinine: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Treatment: 1. Yes; 2. No. Protease inhibitors: 1. Yes; 2. No. Nucleoside analogs: 1. Yes; 2. No. Non-analogs of nucleosides: 1. Yes; 2. No. Others: 1. Yes; 2. No.</p>	<p>POINT IN TIME 2 Date: __ / __ / __ Viral load : _____ Clinical progression : 1. Yes; 2. No. Specify (if 1): _____ Analytical : Creatinine: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Treatment: 1. Yes; 2. No. Protease inhibitors : 1. Yes; 2. No. Nucleoside analogs : 1. Yes; 2. No. Non-analogs of nucleosides : 1. Yes; 2. No. Others: 1. Yes; 2. No.</p>
<p>POINT IN TIME 3 Date: __ / __ / __ Viral load : _____ Clinical progression: 1. Yes; 2. No. Specify (if 1): _____ Analytical : Creatinine: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Treatment: 1. Yes; 2. No. Protease inhibitors : 1. Yes; 2. No. Nucleoside analogs : 1. Yes; 2. No. Non-analogs of nucleosides : 1. Yes; 2. No. Others: 1. Yes; 2. No.</p>	<p>POINT IN TIME 4 Date: __ / __ / __ Viral load : _____ Clinical progression : 1. Yes; 2. No. Specify (if 1): _____ Analytical : Creatinine: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Treatment: 1. Yes; 2. No. Protease inhibitors : 1. Yes; 2. No. Nucleoside analogs : 1. Yes; 2. No. Non-analogs of nucleosides : 1. Yes; 2. No. Others: 1. Yes; 2. No.</p>

Owing to the criteria of inclusion and our operative limitations, a total of 61 patients were finally included in this study, 25 of whom had undergone viroimmunological failure during the period of study. Most of these were males (75.4%) with an average age of 38.3; the most frequent mechanism of transmission was parenteral drug use. The period of evolution of the HIV infection until time of inclusion was between 1 and 17 years, with an average of 8.14 years and a standard deviation of 4.95 years. The time of evolution of HIV infection was homogeneous

for the different viroimmunological situations, with a mean between 7.3 and 9 years. As for the clinical/viroimmunological state, 23 patients presented state A (most of them A2 or A3), 17 were in state B, and 21 in state C (all of these C3).

Dates of clinical parameters suggest that patients show an important stability in parameters obtained during the period of study. In the patients with viral failure, a high viral load and a small increase of GPT was seen at point 3 (viral failure). It should be underlined that counts of CD4⁺ lymphocytes were comparatively higher in patients with viral failure than in viroimmunologically stable patients. Thus, a mean of 401.92 CD4⁺ cells/ μ L at point 3 was obtained for patients with virological failure, this value being higher than the mean in viroimmunologically stable patients with CD4⁺ < 200 and 200-500.

A total of 174 serum samples were obtained, though not all patients provided samples corresponding to each of the four points. Analytical determinations in virological failure and viroimmunologically stable samples show nearly significant differences in GPT values (for unequal variances $t_{\text{exp}} = -2.4576$; $p < 0.01$). For the rest of the parameters, no significant differences were observed between the two groups.

Hsp70 determinations reflect considerable variability, although the detection of high levels of Hsp70 in patients with virological failure can be seen to coincide with the particular point of virological failure (point 3). Among viroimmunologically stable patients, Hsp70 values are very homogeneous.

In the study of sera, the value of Hsp70 in the group with viral failure showed 703.49 ± 3055.09 ng/mL, nearly 10 times higher than in viroimmunologically stable patients, 70.44 ± 144.26 ng/mL. These differences are not statistically significant because of the variability of values of our study. Concentrations of Hsp70 were from 0 until 14032.14 ng/mL. Patients that underwent virological failure had high values; whereas in the other group of patients, higher values were 343 ng/mL for control subjects, and from 54 to 906 ng/mL for viroimmunologically stable patients.

In order to analyse the relationship between concentrations of Hsp70 and clinical or analytical parameters, a logarithmic transformation of Hsp70 was performed. No significant association could be established between the neperian logarithm of Hsp70 and CD4⁺, neperian logarithm of viral load, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺; although the

association between Hsp70 and biochemical parameters in serum like creatinine and cholesterol did not show a significant difference, but the results suggest a sign. However, there were significant differences regarding the association between logarithmic values for of Hsp70 concentrations and the concentrations of hepatic enzymes GPT and CPK.

We did not arrive at significant differences in the concentrations of Hsp70 in those patients either receiving or not receiving protease inhibitors, yet there was a significant difference between those receiving analogs or non-analogs of nucleosides and those who did not.

The mean values of $CD4^+$ are not lower in situations of viroimmunological failure than in situations of stability. A mean of 373.56 ± 249.18 was obtained in serum with viral load > 50 copies/mL; whereas the mean was 539.18 ± 321.67 $CD4^+/\mu L$ in patients who had a viral load of < 50 copies/mL or undetected, the association between both of them resulting not significant. This suggests that $CD4^+$ counts, which are indicative of the immunological situation, were not to be considered a sign of virological failure.

One possibility is that Hsp70 levels might be dependent upon the concentrations of $CD4^+$. With this hypothesis in mind, the possible association between Hsp70/ $CD4^+$ and the rest of parameters was explored.

The analysis of neperian logarithm Hsp70/ $CD4^+$ showed smaller variability parameter, and significant differences were seen according to the immunological situation of the patients: the patients with $CD4^+ < 200$ gave significantly lower than the other groups. Likewise, significant results were also seen regarding the point of failure of those patients that underwent virological failure.

There were no significant associations between the neperian logarithm of Hsp70/ $CD4^+$ and the logarithm of viral load, creatinine or cholesterol. Depending on the treatment received, significant differences were obtained between patients receiving protease inhibitors and patients not receiving this type of treatment ($p < 0.05$), but not for the other types of treatment.

The analysis was again repeated using Hsp70/ $CD8^+$ in absolute value and logarithmic value. Again, no significant differences were seen in relation with the

immunological state, most likely because the values among the proportion of patients with virological failure were significantly higher than for the rest of patients ($p < 0.05$). These differences are not significant when the zero values are rejected.

The neperian logarithm $\text{Hsp70}/\text{CD8}^+$ did not show a significant association with parameters viral load, CD4^+ , CD8^+ , $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, creatinine, cholesterol or GPT. However, the hepatic enzyme CPK showed a significant association with the $\text{Hsp70}/\text{CD8}^+$ logarithm. These results point to non-significant differences between the neperian logarithm $\text{Hsp70}/\text{CD8}^+$ and the time of evolution of the disease.

Finally, the evolution of Hsp70 levels during the follow-up period of patients showed a peak at point 3 (virological failure) in these patients. When the viral load was restored, the levels of this protein returned to previous levels. These results were not significant, even when the logarithmic transformation of Hsp70 was analysed. However, $\text{HSP70}/\text{CD4}^+$ showed an increase in the situation previous to failure (point 2) which are not related to a decrease of CD4^+ , as the mean of this parameter did not display any great variance over the different points. This ratio might serve as a useful marker for the prognosis and prevention of viroimmunological failure.

CONCLUSIONS

From this study of the levels of Hsp70 in HIV seropositive patients with regards to the viroimmunological situation and other variables of epidemiological interest, we arrive at the following conclusions:

1. Concentrations of Hsp70 detected are 10 times higher in patients with viroimmunological failure than in virologically stable ones. Even if we can not rule out statistically that observed differences are because of at random; the confirmation of results could have considerable clinical importance.
2. Clinical and statistical differences were not seen for the concentrations of Hsp70 in patients with viral load < 50 copies/mL with respect to established categories on the basis of lymphocyte CD4^+ counts, or within one same category over time.
3. There is a significant association between levels of Hsp70 and CPK and GPT enzymes, these levels of Hsp70, and the types of antiretroviral treatment

involved; and so there is a potential utility for this protein in the prognosis, monitoring of treatment, or detection of adverse effects. These points call for further analysis.

4. Patients with stable viral load during the follow-up period have constant levels of Hsp70. Patients undergoing virological failure have increased concentrations of this protein in serum corresponding with the point of failure.
5. Concentrations of Hsp70 in serum are higher in patients with antiretroviral treatment, which might signal that this parameter is useful in the adjustment and follow-up of treatment, though more specific studies are needed.
6. Hsp70/CD4⁺ is higher when the situation is poorer, that is, during virological failure or severe clinical state of the disease. In the study about evolution in patients with virological failure, Hsp70/CD4⁺ presents higher values at points previous to virological failure. This finding suggests that this parameter could be very useful as a prognostic marker in HIV+ subjects.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
Introducción	1
Las proteínas de estrés	4
Morfología	8
Funciones	10
Control y regulación	16
Proteínas de estrés y procesos patológicos	19
Infección por VIH y SIDA	24
Definición de caso de SIDA	27
La infección por VIH	28
1. Agente etiológico	28
2. Replicación viral	30
3. Desarrollo de la enfermedad	31
Epidemiología del SIDA	38
Vigilancia epidemiológica	43
Prevención primaria de la infección por VIH	46
Vacunas frente a VIH	48
Tratamiento de la infección por VIH	50
Toxicidad del tratamiento antirretroviral	56
Otros fármacos de nuevo desarrollo	56
Prevención secundaria de la infección por VIH	77
Resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales	57
Objetivos	58
Material y métodos	60

Selección de los casos	61
Diseño	61
Ámbito	61
Periodo de estudio	61
Poblaciones de estudio	62
Selección de los pacientes	63
Fuentes de información	64
Variables de estudio	64
Recogida y tratamiento de muestras	67
Cuantificación de Hsp70	68
Material	69
Reactivos	70
Procedimiento	70
Análisis estadístico	72
Resultados	74
Características de los pacientes	75
Estudio descriptivo de las muestras de suero	90
Determinación de Hsp70	92
Relación Hsp70/CD4 ⁺	105
Relación Hsp70/CD8 ⁺	112
Hsp70 en los puntos de muestreo para pacientes con fracaso virológico	119
Discusión	123
Conclusiones	134
Bibliografía	137

Introducción

Las proteínas de estrés fueron descritas por primera vez en 1962 por Ritossa en células de las glándulas salivares de *Drosophila*, después de ser expuestas a 37 °C durante 30 minutos y a continuación a su temperatura normal de 25 °C, lo que producía un incremento en la síntesis de proteínas con peso molecular de 70 y 26 kDa. Estas proteínas fueron llamadas *heat shock proteins* (Hsp), en español proteínas de estrés térmico.

Realmente no fue hasta 1974 cuando se identificó la primera proteína sintetizada en condiciones de exposición a un shock térmico y se designó el término de proteínas de estrés térmico, sin embargo, esta no es una denominación precisa, ya que no es este el único detonante de su síntesis.

Un grupo de investigadores observó que al aplicar temperaturas elevadas a las células se producía un engrosamiento en el cromosoma donde se sitúan genes que codifican proteínas de estrés. Las células que se exponían a un shock térmico suave, soportaban mucho mejor la exposición a un segundo shock (células termotolerantes) y además eran menos susceptibles a sustancias tóxicas (WELCH, 1993). Por ejemplo, el pretratamiento con malation en *Daphnia magna* la protegía de las siguientes exposiciones a este insecticida a concentraciones que normalmente serían letales (BOND y BRADLEY, 1993). Esto suponía un efecto protector que se atribuyó a la síntesis y liberación de Hsp.

En condiciones normales las Hsp representan de un 5 a un 10% del contenido proteico total de la célula. Su síntesis se puede inducir por cualquier tipo de agresión celular que provoque desnaturalización de las proteínas: temperaturas elevadas, presencia de radicales libres, déficit nutricionales, radiaciones UV, tóxicos químicos,

etanol, infecciones virales o lesiones isquémicas. A pesar de ello, se ha impuesto la terminología de proteínas de estrés térmico. Para indicar las proteínas se utiliza la letra H con mayúscula, seguida de s y p con minúscula (Hsp), mientras que los genes correspondientes se indican con minúscula (hsp), por último, las proteínas constitutivas se expresan como Hsc, aunque no todos los autores se ajustan a esta nomenclatura (CORONATO y cols., 1999).

Tras su identificación inicial se han ido agrupando en familias de acuerdo con su peso molecular, al mismo tiempo se han ido esclareciendo funciones y mecanismos de acción fundamentalmente a nivel intracelular. Actualmente se realizan numerosas investigaciones en el campo de la proteómica para esclarecer aspectos de estas proteínas, tales como su estructura molecular, control y regulación, inductores, funciones, etc.

Inicialmente se las considera sustancias intracelulares, que sólo debían encontrarse en el medio externo en situaciones de necrosis celular, cada vez más indicios apuntan hacia funciones de mediadores extracelulares que podrían regular fenómenos tan complejos como la respuesta inflamatoria e inmunológica. Esto hace que en Salud Pública se abra un enorme campo de investigación: si determinadas sustancias tóxicas pueden estimular la síntesis y liberación de Hsp, su presencia indicaría la exposición a tóxicos, contaminantes ambientales o laborales. Por otra parte, se alteran en diferentes procesos mórbidos, lo que ofrece interesantes posibilidades tanto diagnósticas como terapéuticas ¿Podrían utilizarse como indicador de exposición ambiental en un futuro? y ¿podrían tener utilidad como biomarcador en Salud Pública?.

LAS PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Son proteínas presentes en todas las células que intervienen en la función de síntesis proteica, uniéndose a las proteínas nacientes para dirigir su plegamiento, lo que garantiza su estructura tridimensional y con ello su funcionamiento correcto. Además son capaces de unirse a péptidos y proteínas dañadas por diversos tipos de agresiones, facilitando su reparación o degradación. Cuando la célula se expone a circunstancias adversas se produce un rápido aumento en las concentraciones de Hsp. Son inducidas en respuesta a un amplio espectro de agresiones fisiológicas y ambientales: infección viral, inflamación, fiebre, exposición de las células a compuestos químicos, citocinas, anoxia, shock térmico, pH ácido, etc. Este es un mecanismo de defensa que permite a la célula adaptarse a condiciones anómalas y aumentar su capacidad de supervivencia (BRENNER y WAINBERG, 1999; KIANG y TSOKOS, 1998).

Los diferentes tipos de condiciones que dan lugar a una elevada expresión de genes de shock térmico pueden clasificarse en 3 categorías (Tabla 1):

1. *Condiciones ambientales* (shock térmico, fármacos, estrés oxidativo, tóxicos químicos y pequeñas moléculas farmacológicamente activas).
2. *Condiciones fisiológicas* (ciclo celular, factores de crecimiento, desarrollo celular, diferenciación tisular, hormonas endocrinas).
3. *Condiciones patológicas*: daño y reparación tisular, fiebre, inflamación, infección, isquemia, reperfusión, cancer, etc. (NOLLEN y MORIMOTO, 2002a). Cuando se produce una isquemia como consecuencia de una falta

de riego sanguíneo debido a un infarto se va a producir esta respuesta al estrés, pero también se producirá cuando se recupera el flujo sanguíneo muy rápidamente (reperfusión) (WELCH, 1993).

Tabla 1. Diferentes condiciones que inducen la expresión de Hsp (KIANG y TSOKOS, 1998).

CONDICIONES FISIOLÓGICAS	CONDICIONES PATOLÓGICAS	CONDICIONES AMBIENTALES
Ciclo celular	Infección producida por virus, bacterias y parásitos	Shock térmico
Factores de crecimiento	Fiebre	Metales pesados
Diferenciación celular	Inflamación	Inhibidores metabólicos
Desarrollo tisular	Isquemia-reperfusión	Antibióticos
Estimulación hormonal	Autoinmunidad	Radiación

En cada una de estas categorías, las condiciones indicadas están asociadas con la sobreexpresión de una o más proteínas de shock térmico, debido a que las células han sido sometidas a cualquier tipo de estrés, lo que nos va a servir como indicador de la magnitud de la agresión (WELCH, 1993; NOLLEN y MORIMOTO, 2002a). Se ha demostrado inducción mediante agentes tóxicos celulares tales como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, tetraclorofenol, cloracetamida, arsenito sódico, y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno a concentraciones subletales, teniendo interés esta respuesta por su aplicación como biotest de ecotoxicidad (MOLINA y cols., 2002; BIERKENS, 2000; ÖDBERG-FERRAGUT y cols., 1991).

Hoy se sabe que los mecanismos que conducen a la apoptosis y a la respuesta frente al estrés están unidos. Las condiciones que inducen la respuesta al estrés pueden conducir a la apoptosis o necrosis, en función de la intensidad y duración del

estrés. El balance entre las proteínas que inducen o inhiben la apoptosis determinará si esta se produce. Además, la exposición celular a un estrés de mediana intensidad, suficiente para inducir la expresión y acumulación de Hsp, protege frente a posteriores exposiciones a otros tipos de estrés letales por sí solos (JOLLY y MORIMOTO, 2000).

Con el paso del tiempo se ha ido profundizando en el conocimiento de las Hsp y atribuyéndoseles un papel más complejo. Una de las características que mayor interés ha despertado en los últimos años ha sido su capacidad para situarse en el exterior de la superficie celular, independientemente o ligadas a péptidos dañados, y actuar como antígenos capaces de unirse a los receptores de macrófagos y células dendríticas, desencadenando el inicio de una respuesta inflamatoria o inmunitaria. También dirigen a las moléculas que participan en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (WELCH, 1993).

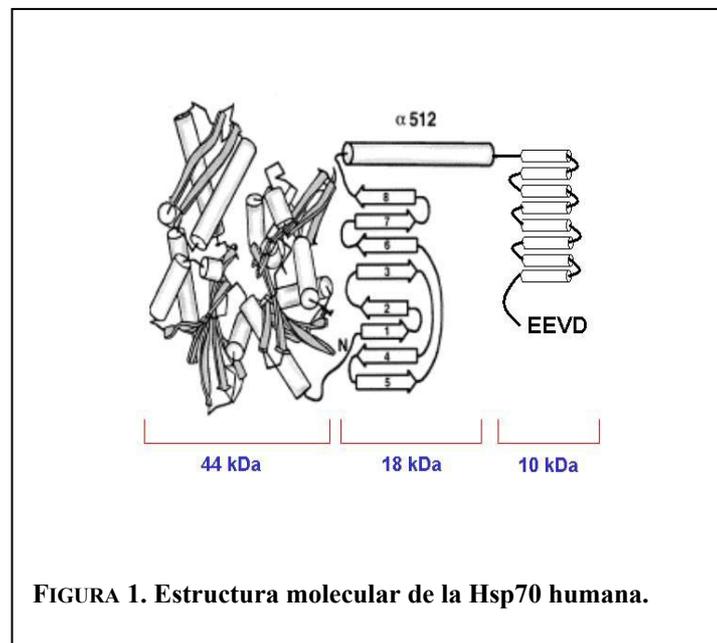
KIANG y TSOKOS (1998) clasificaron las proteínas de estrés en diferentes grupos (Tabla 2):

- a) Las más importantes son las de alto peso molecular: 60, 70, 90 y 110 kDa, siendo sintetizadas a 37 °C en ausencia de shock térmico. Hsp70 y Hsp90 se encuentran en todos los organismos, mientras que Hsp110 está presente principalmente en células de mamíferos.
- b) El segundo grupo de Hsp, menos importante, comprende las proteínas inducidas en condiciones de privación de glucosa, por lo que se denominan *glucose-regulated proteins* (Grp).
- c) Un tercer grupo son las Hsp de bajo peso molecular, alrededor de 20 kDa encontradas en células de *Drosophila* sometidas a shock térmico y en cardiomiocitos isquémicos de ratas.

Tabla 2. Diferentes familias de proteínas de estrés. Localización y función celular (POCKLEY, 2003; JOLLY y MORIMOTO, 2000).

FAMILIA	LOCALIZACIÓN CELULAR	FUNCIÓN CELULAR
Hsp 100	Citoplasma	Replegamiento de proteínas. Termotolerancia
Hsp90	Citoplasma. Retículo endoplasmático.	Previene la agregación de péptidos replegados. Correcto ensamblaje y plegamiento de proteínas nuevamente sintetizadas. Mantenimiento del estado monomérico de HSF1 en condiciones normales.
Hsp70	Núcleo. Citoplasma. Mitocondria. Retículo endoplasmático.	Previene la agregación de péptidos desplegados. Disociación de oligómeros. Actividad ATPasa. Regulación de la actividad de HSF1. Represión de la transcripción de genes del shock térmico.
Hsp60	Mitocondria	Unión parcial a polipéptidos plegados. Correcto plegamiento. Ensamblaje de complejos multiméricos.
Hsp de bajo peso molecular	Citoplasma. Núcleo.	Impide agregación de proteínas. Protección frente a la polimerización.

Las Hsp70 son proteínas muy conservadas en la escala filogenética, demostrándose 60-78 % de identidad de bases entre células eucarióticas de diferentes especies, y un 40-60 % de identidad entre Hsp70 de eucariotas de mamíferos y la Hsp70 denominada DnaK de *Escherichia coli*. Forman una gran familia multigénica, inducibles, que residen en diferentes compartimentos subcelulares tales como la



mitocondria, el núcleo, el citoplasma y el retículo endoplasmático (SHARP y cols., 1999; BROCHE VALLE y cols., 1999; HOLMBERG, 2000).

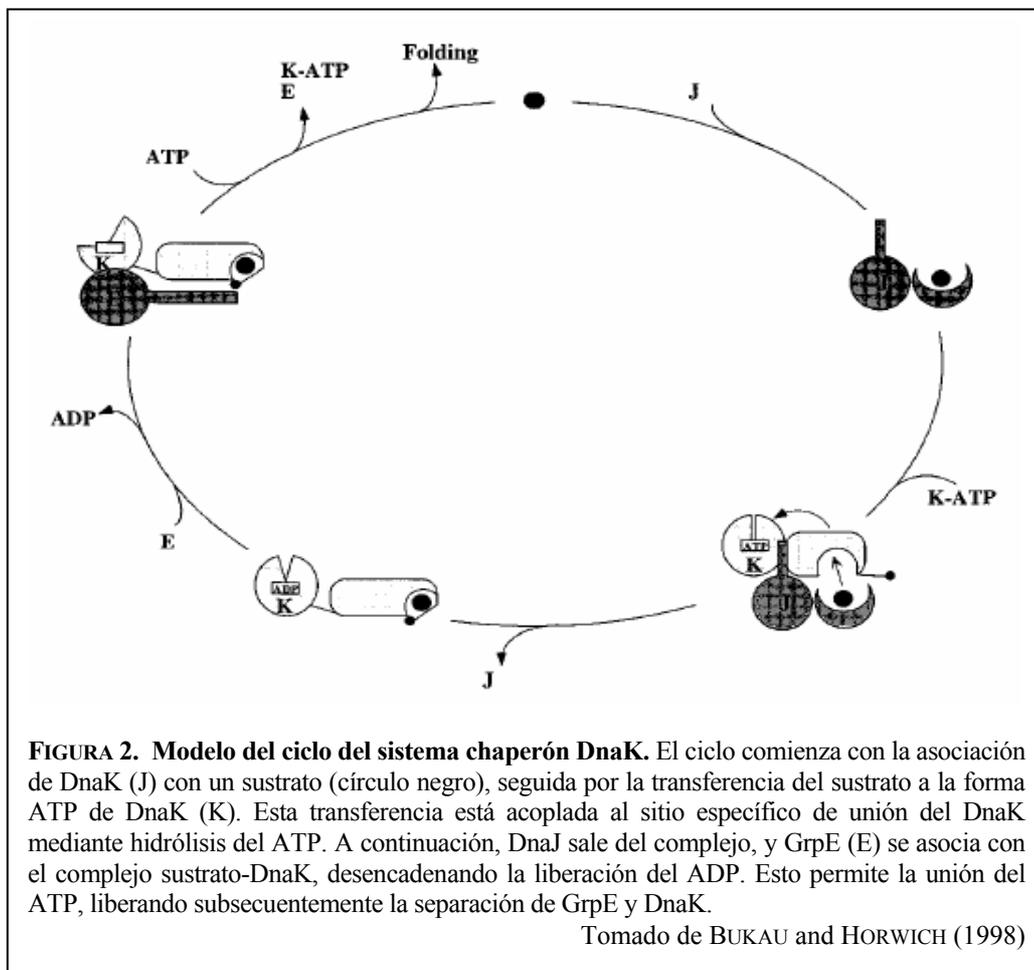
Morfología

Se han realizado grandes avances en el conocimiento de la estructura de las proteínas de estrés, de las que se sabe que están constituidas por varias partes o dominios (Figura 1). La parte N-terminal de 44 kDa corresponde a la ATPasa, el componente de 18 kDa es la zona de unión al péptido, y la zona C-terminal de 10 kDa contiene la secuencia de aminoácidos EEVD¹, presente en las Hsp70 y Hsp90 de células eucarióticas. El dominio ATPasa N-terminal contiene 4 regiones que forman dos lóbulos con una fisura entre ellos. Junto a éste, se encuentra el dominio

¹ E: Glutamato; V: Valina; D: Aspartato

de 18 kDa, donde se van a unir péptidos plegados y no plegados, formado por 2 β -láminas antiparalelas y una lámina α -hélice.

Escherichia coli contiene dos proteínas Hsp70 diferentes: DnaK y Hsc66 (Figura 2). Se observó que el dominio donde se une el péptido puede adoptar dos estados, abierto o cerrado, relacionados con la hidrólisis de ATP. Cuando se encuentra en estado abierto, el polipéptido se va a unir a una especie de canal que posee este dominio; una vez que el péptido se ha unido, se produce la hidrólisis de ATP del dominio ATPasa que pasa a ADP, y el dominio donde se une el péptido adopta un estado cerrado. GrpE promueve la liberación de ADP del dominio ATPasa por lo que



una nueva molécula de ATP se puede volver a unir, adoptando una forma abierta, así se libera el péptido, y comienza un nuevo ciclo con la unión de otro péptido (RASSOW y cols., 1997).

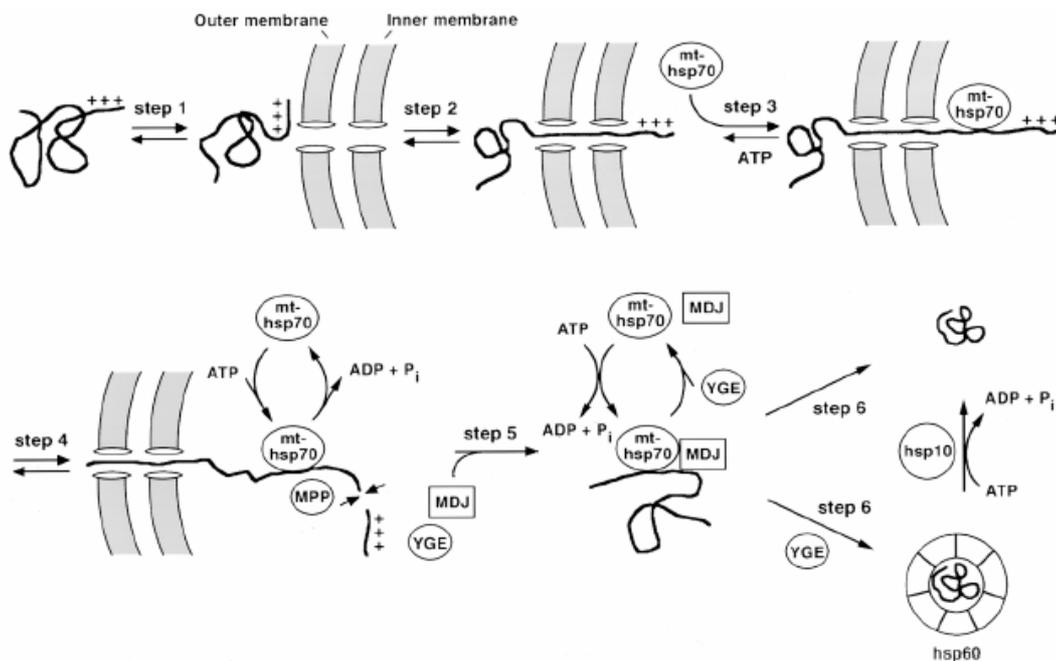
Funciones

Aunque desde el comienzo, el shock térmico se ha asociado a causas ambientales, el mismo efecto provocan otros tipos de estrés tanto fisiopatológicos como bioquímicos, incluyendo la respuesta celular a la infección causada por agentes virales y bacterianos, exposición a metales pesados de transición, análogos de aminoácidos, pequeñas moléculas farmacológicamente activas y oxidantes. Común a todos estos tipos de estrés son los efectos asociados al plegamiento, translocación, ensamblaje y degradación de las proteínas. El estrés produce un incremento de proteínas no plegadas, así como un incremento del desplegamiento y formación de agregados de proteína, lo que induce una respuesta celular mediada por una síntesis elevada de chaperones moleculares y proteasas, cuyo objetivo será reparar el daño proteico (NOLLEN y MORIMOTO, 2002b).

Varios estudios han demostrado que el plegamiento de proteínas y su ensamblaje no se produce de una manera espontánea sino que requiere la ayuda de una serie de proteínas que reciben el nombre de *chaperones moleculares*, también llamadas proteínas acompañantes o chaperoninas, que se unen a proteínas desplegadas o desensambladas; ligan y estabilizan proteínas en estadios intermedios de plegamiento, ensamblaje, translocación a través de membranas y degradación. De ellas podemos destacar que no tienen especificidad por el sustrato, como ocurre con los enzimas, y el estar muy distribuidas en el interior de la célula sin formar parte de

un complejo, impiden la interacción proteína-proteína que facilita el plegamiento con la intervención de una gran cantidad de componentes (MADIGAN y cols., 1997a; KIANG y TSOKOS, 1998; BROCHE VALLE y cols., 1999).

Alrededor de 1980, algunos investigadores observaron la existencia de agentes desnaturalizantes que daban lugar a la alteración de la conformación normal de las proteínas, provocando una respuesta al estrés, de tal forma que las antiestrés localizan a las proteínas alteradas y las devuelven a su conformación correcta (WELCH, 1993). Cuando existen proteínas desplegadas o mal plegadas, los chaperones se van a unir a



ellas hasta que alcanzan un adecuado plegamiento, mediante la ayuda de energía adquirida del ATP, por último las proteínas se separarán de los chaperones moleculares (MADIGAN y cols., 1997a; KIANG y TSOKOS, 1998; BROCHE VALLE y cols., 1999).

FIGURA 3. Representación esquemática del proceso por el que Hsp70 participa en el tránsito de las proteínas desplegadas a través de la membrana mitocondrial.

Tomado de KIANG y TSOKOS (1998)

Otra de las funciones que realizan este tipo de proteínas de estrés es la participación en el transporte de las proteínas a través de la membrana de distintos compartimentos (Figura 3). El paso por ésta produce la parada de la transducción para que la cadena polipeptídica no sea muy larga, porque al plegarse puede producir la obstrucción del canal. Esta función se va a favorecer por la ayuda de unos co-chaperones, como GrpE y Hsp10 (proteínas que regulan la función de chaperones moleculares); el primero cataliza el intercambio de ADP/ATP en Hsp70 y el segundo se une a Hsp60 para regular la actividad como chaperón molecular. Estos cofactores provocan la maduración del proceso para llegar a la conformación nativa de la proteína (KIANG y TSOKOS, 1998).

Los chaperones moleculares, inducidos en respuesta al estrés, son claves para la regulación de la apoptosis y el crecimiento de la célula, lo cual tiene una gran importancia por su relación con el cáncer y la liberación de proteínas que pueden inducir respuesta inmunitaria (JOLLY y MORIMOTO, 2000; KUMAZAKI y cols., 1997; BRENNER y WAINBERG, 1999; BRENNER y WAINBERG, 2001).

Dentro de cada una de las familias de proteínas de estrés podemos destacar varias características de las funciones que realizan:

La familia Hsp70 va a estabilizar la estructura de las proteínas cuando existe una competencia entre el estado desplegado y el estado de ensamblaje durante un periodo largo de tiempo, además se unen a cadenas polipeptídicas durante la síntesis de proteínas.

Las Hsp60 mitocondriales forman un anillo oligomérico donde se produce el ensamblaje de la proteína para alcanzar su estado nativo.

Las Hsp90 tienen un papel como supresor en la regulación, mediante la unión a diferentes enzimas, factores de transcripción y receptores de hormonas esteroides (KIANG y TSOKOS, 1998). Estas proteínas están unidas a un receptor esteroídico; cuando en la célula entran este tipo de hormonas, las Hsp90 se separan del receptor y se unen a ellas; así forman un complejo que interacciona con el DNA, por lo que activará o reprimirá la expresión de genes. Es decir, las Hsp90 regulan la actividad biológica de los receptores de hormonas esteroides (WELCH, 1993). Los niveles de Hsp están relacionados con los niveles de estrógenos y progesterona durante el ciclo menstrual. Los estrógenos pueden provocar un aumento significativo de los niveles de Hsp70 y Hsp90 en las hembras de ratas pero no en los machos (KIANG y TSOKOS, 1998; HOLMBERG, 2000).

Por último, las Hsp27 impiden la agregación de proteínas y protegen frente a la polimerización (KIANG y TSOKOS, 1998).

Las proteínas de estrés pueden desencadenar una respuesta inmunológica como consecuencia de actividades intra y extracelulares. A nivel intracelular las Hsp actuando como chaperones se ligan a las proteínas sintetizadas en la célula. Significa que en cualquier momento las Hsp pueden encontrarse dentro de la célula unidas a un amplio rango de péptidos que representan un auténtico catálogo de las proteínas existentes en el interior de la célula. En dicho catálogo encontramos péptidos normales presentes en todas las células, y péptidos anómalos que se encontrarán sólo en células dañadas. Los estudios realizados sobre el tema sugieren que las Hsp toman estos péptidos anómalos (antígenos) y, directamente o a través de otros grupos de moléculas los trasladan al exterior de la superficie celular. Así los péptidos anómalos actúan como señales de alarma que alertan al sistema inmunológico de que la célula está dañada. Por tanto, cuando se detectan fuera de la célula indican que esta ha sido agredida, o incluso que ha sido destruida, expulsando todo su contenido. Una vez que los complejos de Hsp y péptidos están fuera de la célula son detectados por el sistema inmune a través de macrófagos y células dendríticas, denominadas *células*

presentadoras de antígenos (en inglés *antigen-presenting cells*, APCs). Después de ser detectado, el complejo de Hsp entrará dentro de estas células a través del receptor CD91, y será transportado a los nódulos linfáticos, allí las APCs presentan en su superficie al péptido que estaba formando un complejo con las Hsp, que al ser antigénico pueden estimular una respuesta inmune (BINDER y cols., 2004; CAMPISI y cols., 2003; POCKLEY, 2003; WELCH, 1993; DENAGEL y PIERCE, 1993).

Una respuesta inmunológica interesante es la que producen diversas infecciones por bacterias y parásitos, tal como ocurre en enfermedades como tuberculosis y lepra. Estos patógenos cuando entran en el organismo huésped están sometidos a mecanismos de defensa produciendo sus proteínas de estrés, que actúan como antígenos frente a los que el huésped produce una respuesta inmune. Dos son las razones que explican que las Hsp originen esta respuesta:

1. Los patógenos durante la fagocitosis en macrófagos encuentran un ambiente hostil, expresando Hsp que son procesadas, los péptidos derivados de estas proteínas se unen a MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de clase I ó II y son presentados al sistema inmune.
2. Las proteínas son altamente conservadas entre patógenos y huésped, lo que favorece la producción de una reacción cruzada entre las proteínas del huésped y del patógeno, las primeras actúan como antígenos (autoantígenos) y provocan enfermedades autoinmunes, tales como diabetes mellitus insulínica (DMID), artritis reumatoide, esclerosis múltiple, etc. En un futuro podría ser que estas proteínas tengan un papel en el desarrollo de inmunoterapias para ciertas enfermedades autoinmunes, es decir, las enfermedades como la DMID y artritis reumatoide animal se podrían prevenir mediante la inmunización con Hsp60 (WELCH, 1993).

Hasta ahora hemos mencionado varias de las funciones más importantes de las proteínas de estrés, pero existen otras como la participación en los mecanismos de transducción de señales y regulación de la expresión génica; protección de la célula en situaciones de estrés, siendo una manera de adaptación por parte de ésta; y la activación de una serie de mecanismos metabólicos y proliferativos de la célula, debido a la aparición de diferentes estímulos (BROCHE VALLE y cols., 1999).

La inducción de las proteínas de estrés puede deberse a la aparición de alguna enfermedad inflamatoria, y en este caso se le atribuye un efecto citoprotector. Se ha comprobado que cuando aparecen procesos patológicos de este tipo, o enfermedades cardiocirculatorias tales como la isquemia, se produce una elevada expresión de las proteínas de estrés, y consecuentemente un efecto citoprotector. Este aumento en la expresión de las proteínas de estrés indica una adaptación de la célula a esta nueva situación y conducirá a una síntesis normal de proteínas del miocardio (en el caso de enfermedades coronarias), una disminución de proteínas no plegadas y recuperación funcional de este órgano.

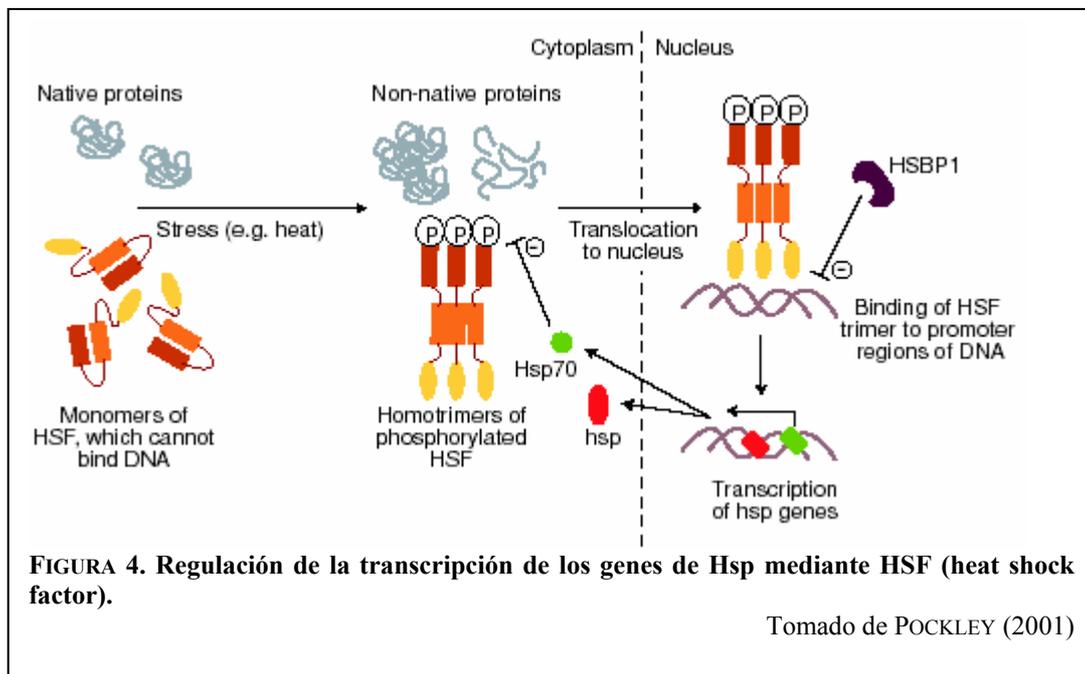
En estas enfermedades, para alcanzar el mayor efecto citoprotector se debe producir una sobreexpresión de los genes que codifican Hsp. Esto se puede conseguir *in vitro* mediante manipulación genética, o más fácilmente, con la aplicación de diversas sustancias inductoras, tales como herbimicina A, derivados de la hidroxilamina, o salicilatos. Mediante este tipo de respuesta se produce un aumento en la transcripción de los genes Hsp que conduce a incrementar el efecto citoprotector en estos procesos patológicos (MORIMOTO, 1999).

El efecto citoprotector tiene una gran importancia en exposición a luz intensa y radiación ultravioleta, o en la conservación de órganos para transplantes. Por ejemplo, se ha demostrado en ratas que las Hsp70 protegen a las células fotorreceptoras de la

retina frente a la degeneración inducida por la luz intensa (JINDAL, 1996; WHEELER y cols., 2002).

Control y regulación

La concentración de Hsp dentro de la célula aumenta hasta dos y tres veces



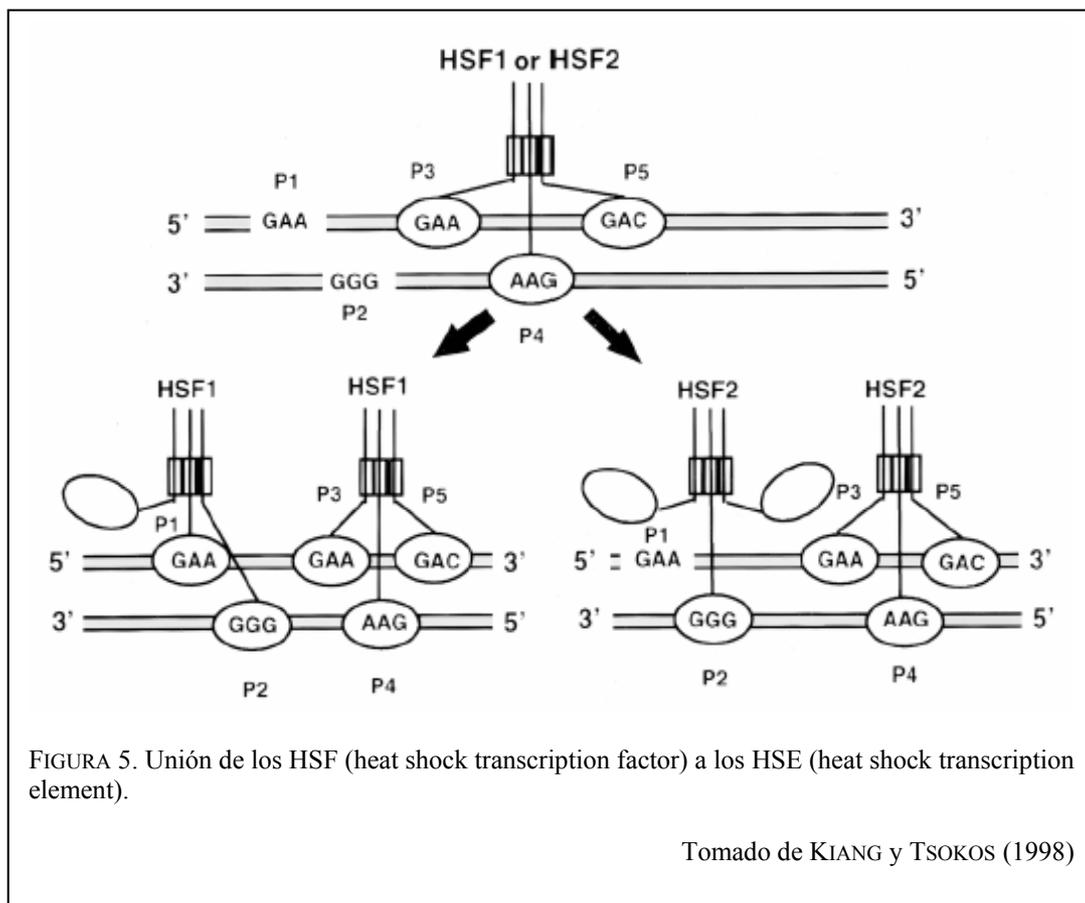
cuando actúan diferentes agresiones sobre ella, y este aumento es regulado transcripcionalmente. La familia de las Hsp70 está codificada por 3 genes que se encuentran en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase III en la región del

cromosoma 6. Estos 3 genes son hsp70-1, constitutivamente expresado aunque a niveles bajos, hsp70-2, y hsp70-HOM (HOLMBERG, 2000).

La transcripción de estos genes está regulada por HSF (heat shock factor). Este factor está presente en el citoplasma como una molécula monomérica latente, incapaz de unirse al DNA. Bajo condiciones de estrés, la producción de proteínas no-nativas conduce a la fosforilación (P) con ayuda de proteínas CPK, y trimerización de HSF (Figura 4). Los trímeros se trasladan al núcleo, se unen a HSE (heat shock element) localizado en las regiones del promotor de los genes de Hsp, e intervienen en la transcripción de estos genes. Los niveles de Hsp nuevamente sintetizadas van a regular la actividad de los trímeros de HSF (KIANG y TSOKOS, 1998; POCKLEY, 2003).

En el promotor del gen *hsp-70* se localizan tres combinaciones perfectas de nGAAn y dos imperfectas, nGACn y nGGGn. Los HSE (heat shock element) en posición 3 y 4 (P3 y P4) son simétricos, y favorecen la unión de los trímeros de los HSF1 y HSF2 (Figura 5). La segunda molécula de HSF1 se une a los HSE en P1 y P2, mientras HSF2 se une a HSE solamente en P2 (KIANG y TSOKOS, 1998).

Se han identificado 4 tipos de HSF en vertebrados, denominados HSF1 a HSF4. De ellos, el HSF1 es el que tiene el papel principal en la respuesta al estrés fisiológico y ambiental, mientras que HSF2 se induce especialmente durante la diferenciación y etapas tempranas del desarrollo (POCKLEY, 2003). HSF2 tiene las características de una proteína termosensible: se inactiva cuando se expone a



temperaturas elevadas, es secuestrado del citoplasma y de esta manera se evita su interferencia con la actividad HSF1 en la célula estresada.

La activación del factor del shock térmico HSF1 no solamente está regulada por la temperatura sino que también va a estar modulada por factores estresantes que tienen un efecto en el crecimiento celular. Se ha observado que HSF1 puede ser activado por un bajo pH o por salicilato, quizás porque actúan sobre la conformación de HSF1 (KIANG y TSOKOS, 1998).

El grado de inducción depende de los niveles y la duración del estrés, de manera que el incremento puede ser transitorio o permanente. La síntesis de Hsp alcanza el máximo a las 3-5 horas después del shock térmico y cesa después de 8 horas, aunque se mantienen por encima de los niveles basales durante días o semanas.

La inducción de las Hsp tiene que estar estrechamente controlada. Su persistencia alteraría gravemente la homeostasis proteica y las funciones intracelulares. Entre los mecanismos de control, POCKLEY (2003) destaca la unión de Hsp70 al HSF1, reprimiendo la transcripción activada por el shock térmico; en definitiva, no es más que un proceso de retroregulación (HOLMBERG, 2000). En este proceso se produce la interacción entre HSBP1 (heat shock binding protein), la forma trimérica activada de HSF1 y Hsp70, cuyo resultado es la inhibición de la capacidad de HSF1 para unirse al DNA.

Proteínas de estrés y procesos patológicos

No se han realizado hasta la fecha gran número de estudios sobre niveles séricos de las Hsp, siendo los trabajos publicados orientados a conocimientos puntuales en diversas patologías sobre poblaciones relativamente pequeñas.

Un análisis global de la bibliografía muestra que en los procesos patológicos infecciosos y no infecciosos se produce una respuesta al estrés. En todos estos procesos se detecta un aumento en la expresión de Hsp.

Aunque los niveles basales de Hsp70 van a estar influidos por varios factores, como la temperatura ambiente (BOSHOF y cols., 2000), hay una sobreexpresión de estas proteínas cuando se comparan enfermos y población sana.

Se acepta que las Hsp en general, y Hsp70 en particular, son secretadas fuera de la célula, por lo que pueden ser detectadas en la sangre de individuos normales y pacientes con infecciones agudas (PANAYI y cols., 2004).

Todos los estudios realizados en población sana muestran mayores niveles basales de Hsp70 en mujeres frente a hombres. En un trabajo realizado en la Universidad de Sheffield (UK), se midieron mediante enzima-inmunoensayo los niveles de Hsp70 en 92 sueros de personas sanas donantes, 47 varones y 45 mujeres, con edades de 20-63 y 20-65 años respectivamente. Los valores medios obtenidos fueron 1131 ng/mL de Hsp70 en hombres y 2543 ng/mL en mujeres. Como podemos observar, las concentraciones en las mujeres son 2 veces mayores que en los hombres (POCKLEY y cols., 1998).

En los pacientes con lesiones traumáticas se ha demostrado un aumento en la expresión de Hsp. Por ejemplo, HASHIGUCHI y cols. (2001) realizaron un estudio comparando 2 grupos de personas, uno de voluntarios sanos y otro de personas que padecían algún traumatismo. Los resultados indican que los niveles de Hsp en los enfermos eran mucho más elevados que en los voluntarios sanos.

Se ha observado un aumento en la expresión de Hsp en tejidos neoplásicos del ovario, mama, endometrio y aparato digestivo. Algunos autores creen que este aumento de las proteínas puede estar relacionado con la elevación de la proliferación celular, desarrollo de metástasis y resistencia a drogas terapéuticas, mientras que otros autores piensan que este aumento hace que las células proliferadas empiecen a diferenciarse. Las células tumorales llegan a los ganglios linfáticos se encuentran con un ambiente inadecuado, de manera que se aumenta el número de Hsp en estas células mejorando así su supervivencia, se eleva el número de células malignas, que desde los ganglios se repartirían por todo el organismo, es decir, la sobreexpresión de las Hsp puede dar lugar a un empeoramiento de la enfermedad. Un mecanismo similar podría resultar ante la exposición a fármacos antineoplásicos, explicando el desarrollo de resistencias. Esto no sucede de una forma general, es decir, depende del tipo de cáncer y de las drogas que se administren, y quizás esté más relacionado con un tipo de Hsp determinada. En aplicación clínica, la modulación de los niveles de expresión de Hsp nos puede ayudar a revertir la resistencia a drogas y controlar el crecimiento tumoral (CORONATO y cols., 1999).

RAMÍREZ y cols. (2001), determinaron Hsp70 en 35 tumores malignos de mama, y en 10 procesos proliferativos no malignos (adenoma de mama y mastopatía fibroquística). Los resultados mostraron la presencia de Hsp70 en todos los tumores y procesos proliferativos no malignos con niveles mayores de estas proteínas en tumores malignos frente a procesos no malignos. Otro hecho importante que se muestra en este trabajo es la localización de Hsp70. En los procesos no malignos, la localización de Hsp70 es citoplasmática, mientras que en todos los casos malignos es nuclear y citoplasmática, lo que hace pensar en la utilidad de las Hsp70 como marcador de pronóstico, ya que estas proteínas están presentes tanto en tumores malignos de mama, como en adenomas y enfermedades fibroquísticas, y sobre todo, por la específica localización nuclear de Hsp70 en los procesos malignos, mientras que en los procesos no malignos la localización es sólo citoplasmática.

El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de muerte en la mujer, por lo que se han realizado numerosos estudios sobre Hsp en este tipo de tumor. Se ha observado que tras la administración de drogas se modifica la expresión de algunas Hsp, lo que sugiere que estas proteínas de estrés pueden servir como marcadores de respuesta a la quimioterapia. Se ha demostrado que pacientes cuyos tumores expresan elevados niveles de Hsp70 nuclear presentaban resistencia al tratamiento, y desarrollaban metástasis. Los mecanismos por los que se producen estas resistencias son desconocidos (CIOCCA y cols., 1992; OESTERREICH y cols., 1993; VARGAS-ROIG y CIOCCA, 2000).

Algunos autores también señalan que la expresión de Hsp70 en el cáncer nos da esperanzas para el desarrollo de terapias nuevas. La utilización actual de drogas como el tamoxifeno o inhibidores estrogénicos, en tratamientos muy prolongados, puede dar lugar a la aparición de resistencias. Se podría diseñar un nuevo tipo de terapia para estas enfermedades mediante tratamientos basados en drogas que inhiben de una forma específica la inducción de proteínas del shock térmico, que tendrían preferentemente como diana las células tumorales, por ejemplo en el cáncer de mama (RAMÍREZ y cols., 2001).

Los estudios sobre diversas enfermedades crónicas y/o degenerativas muestran en general un aumento de las proteínas de estrés. Así se ha observado en la enfermedad vascular periférica y renal, pancreatitis no infecciosa, etc.

WRIGHT y cols. (2000), pensaron en las proteínas del shock térmico como componente inmunológico en el desarrollo de la arterioesclerosis. En los pacientes con enfermedad vascular periférica se observaron niveles mucho más elevados de Hsp70 en el suero de los enfermos que en los controles, y se detectaron en el suero del 76 % de los enfermos, y sólo en el 41 % de los controles.

En la enfermedad vascular renal se observa que las Hsp70 estaban presentes en el 62 % de los pacientes mientras que sólo se pudieron detectar en el 32 % de los sueros control.

En resumen, se demuestra que tanto en sujetos con enfermedad vascular periférica como en aquellos con enfermedad renal vascular, los niveles circulantes de Hsp70 son elevados, aunque resta por determinar su papel fisiológico (WRIGHT y cols., 2000).

Las enfermedades pancreáticas también conducen a un aumento de los niveles de Hsp. En las pancreatitis agudas inducidas por arsenito sódico o arginina, se produce una sobreexpresión de Hsp70, en función de la dosis y del tiempo, que se mantiene elevada durante 24-48 horas (RAKONCZAY y cols., 2003). La preinducción de Hsp pancreática tiene un efecto protector, como han demostrado recientemente BHAGAT y cols. (2002), de tal forma que se pueden considerar como un componente farmacológico para la protección del páncreas, haciendo que drogas no tóxicas activen la respuesta del shock térmico (RAKONCZAY y cols., 2003).

Entre los procesos patológicos infecciosos los trabajos realizados responden al mismo patrón de sobreexpresión de Hsp70. Entre estos procesos tiene especial interés la infección por VIH ya que a diferencia de la mayor parte de los procesos infecciosos se produce una disminución de las células blancas sanguíneas.

Diversos estudios realizados en los que se compara la expresión de Hsp70 en linfocitos de pacientes VIH+ frente a controles, demuestran que la capacidad de producción de Hsp70 en los pacientes fue 4.5 veces superior a la de los controles (AGNEW y cols., 2003; FÜST y cols., 2005).

No se conoce muy bien el papel que las proteínas de estrés juegan en el SIDA. Parece ser que las Hsp que pertenecen a la familia de 70 kDa, tienen un papel

importante en el ciclo de vida de diferentes virus RNA y DNA, entre estos la replicación del virus VIH-1.

WAINBERG y cols. realizaron un estudio *in vitro* para determinar el impacto de la infección aguda por VIH-1 sobre la expresión intracelular de Hsp en líneas celulares linfocíticas de CD4⁺. Durante la fase inicial de infección no se detecta RNA genómico viral hasta 30 horas después de la infección, mientras que la transcripción del RNAm de Hsp70 aparece a partir de las 3-8 horas tras la infección. La transcripción es inhibida durante 24 horas, coincidiendo con la aparición del RNAm del genoma viral, y se reinicia de nuevo al final del ciclo de replicación viral, con la liberación de los viriones y muerte de las células CD4⁺ (WAINBERG y cols., 1997; IORDANSKIY y cols., 2004^a; IORDANSKIY y cols., 2004^b).

Diversas proteínas de estrés, entre ellas las Hsp70, tienen un papel destacado en el ciclo de vida del VIH (BRENNER y WAINBERG, 1999; BRENNER y WAINBERG, 2001). Se ha comprobado la activación de los genes de estrés durante la infección por diversos virus DNA y RNA durante las fases de latencia y lisis. El VIH-1 infecta a los linfocitos uniéndose a los receptores CD4⁺, e induce una expresión prematura de Hsp70 tras la infección viral (WAINBERG y cols., 1997; FURLINI y cols., 1994).

La asociación de proteínas de estrés con los componentes virales facilita su plegamiento, ensamblaje y morfogénesis, con un impacto directo y positivo en la velocidad de la producción viral e infectividad. Así ocurre con el plegamiento y ensamblaje de la proteína gp160 desde su estado nativo, proceso en el que interviene la proteína Hsp70 del retículo endoplasmático. Incluso parece que proteínas Hsp70 inducibles se incorporan específicamente en los viriones VIH-1. Este fenómeno significaría que la propia respuesta celular frente a la infección por VIH favorece el desarrollo de dicha infección, aunque los resultados proporcionados por diferentes autores son contradictorios (BARTZ y cols., 1994).

INFECCIÓN POR VIH Y SIDA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta al hombre produciendo una alteración del sistema inmunitario cuya manifestación más grave es el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Las células afectadas por el VIH son los linfocitos T CD4⁺, la destrucción progresiva del sistema inmunitario, para terminar produciendo una inmunodeficiencia (MADIGAN y cols., 1997^b). Cuando el sistema inmunitario está sensiblemente dañado permite el desarrollo de infecciones oportunistas graves, neoplasias u otras manifestaciones potencialmente mortales. El SIDA no es más que una agrupación de posibles complicaciones que aparecen en el sujeto inmunodeficiente. Se admite la presencia de SIDA cuando existe una infección por VIH y el recuento de CD4⁺ es inferior a 200 células/ μ L o bien aparece alguna de las patologías incluidas entre los criterios de SIDA que se recogen en la Tabla 3 (CDC, 1992).

El SIDA es una enfermedad de declaración obligatoria (HERRUZO CABRERA y cols., 2001). Desde un punto de vista epidemiológico, interesa vigilar la incidencia de SIDA para evaluar la situación y tendencias de la epidemia, así como el desarrollo y prevalencia de nuevas infecciones por VIH. Determinar la existencia de esta infección ofrece oportunidades de prevención primaria (identificación y control de prácticas de riesgo y prevención de nuevas infecciones), y de prevención secundaria (tratamiento), con el objetivo de detener o retrasar el deterioro inmunitario. La definición de infección por VIH se convierte en prioritaria, y recientemente se han propuesto nuevos criterios de definición, en los que se contemplan los avances de métodos diagnósticos. En adultos, adolescentes o niños mayores de 18 meses la infección por VIH se define cuando se cumplen los criterios de la Tabla 3 (CDC, 1999).

Tabla 3. Criterios para infección por VIH en adultos (CDC, 1992).**CRITERIOS DE LABORATORIO**

(debe cumplirse algunos de los dos siguientes criterios)

- a) Resultado positivo en tests para anticuerpos frente a VIH (enzimoinmunoensayo), seguido por un resultado positivo con anticuerpos específicos identificados por otros tests (Western blot, inmunofluorescencia).
- b) Resultado positivo en cualquiera de los siguientes tests: aislamiento del virus mediante cultivo viral, detección de antígenos p24 de VIH y ácido nucleico de VIH (DNA o RNA) mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

CRITERIOS CLÍNICOS

- a) Diagnóstico de infección por VIH basado en criterios de laboratorio documentado en una historia clínica.
- b) Condiciones que cumplen los criterios de definición de caso de SIDA.

La clasificación revisada por el CDC clasifica a las personas infectadas de acuerdo con el recuento de linfocitos-T CD4⁺ y las condiciones clínicas asociadas a la infección por VIH, obteniéndose una matriz con 9 clases diferentes (Tabla 4) . Se establecen tres rangos de linfocitos-T CD4⁺ (Tabla 5) y tres categorías clínicas (Tabla 6).

Tabla 4. Clasificación del estadio en la infección por VIH.

CATEGORÍAS INMUNOLÓGICAS	CATEGORÍAS CLÍNICAS		
	A: leves	B: moderados	C: severos
1 Normal	A1	B1	C1
2 Moderada	A2	B2	C2
3 Grave	A3	B3	C3

Tabla 5. Categorías de recuento de linfocitos T CD4⁺

- a) Categoría 1: recuento mayor o igual a 500 células/ μ L.
- b) Categoría 2: 200-499 células/ μ L.
- c) Categoría 3: menos de 200 células/ μ L.

Tabla 6. Categorías clínicas en la infección por VIH**CATEGORÍA A**

Una o más de las condiciones listadas a continuación, con infección documentada

- a) Infección por VIH asintomática.
- b) Linfadenopatía persistente generalizada.
- c) Infección VIH aguda (primaria) con enfermedad acompañante, o historia de infección aguda por VIH.

CATEGORÍA B

Persona con infección por VIH cuya sintomatología no se incluye en la categoría C y presenta al menos uno de los siguientes criterios:

- a) Sus síntomas se atribuyen a una infección por VIH, o son indicativos de un defecto en la inmunidad mediada por células
- b) Estimar que cursa una enfermedad que está complicada por una infección por VIH

Enfermedades de esta categoría

- 1) Angiomatosis bacilar.
- 2) Candidiasis orofaríngea
- 3) Candidiasis vulvovaginal
- 4) Displasia cervical (moderada o severa)/carcinoma cervical in situ.
- 5) Síntomas generales tales como fiebre (38.5 °C) o diarrea que duran más de 1 mes.
- 6) Leucoplasia vellosa oral.
- 7) Herpes zoster (al menos dos episodios distintos o más de un dermatoma.
- 8) Púrpura trombocitopenica idiopática.
- 9) Listeriosis.
- 10) Enfermedad pélvica inflamatoria, especialmente si está complicada por abscesos tubo-ovaricos.
- 11) Neuropatía periférica.

CATEGORÍA C

Incluye las condiciones clínicas establecidas en la definición de caso para la vigilancia de SIDA (Tabla 7).

Definición de caso de SIDA

Todas las personas con infección por VIH confirmada mediante pruebas de laboratorio, con un recuento de linfocitos T CD4⁺ inferior a 200 células/ μ L, ó un porcentaje de CD4⁺ inferior al 14 %, ó con una de las condiciones clínicas establecidas en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones clínicas establecidas para la definición de caso para la vigilancia de SIDA.

- 1) Candidiasis de bronquios, tráquea o pulmonar.
- 2) Candidiasis esofágico
- 3) Cáncer cervical invasivo.²
- 4) Coccidioidomicosis, diseminada o extrapulmonar.
- 5) Criptococosis extrapulmonar.
- 6) Criptosporidiosis intestinal crónica (con duración superior a 1 mes).
- 7) Enfermedad por citomegalovirus.
- 8) Retinitis por citomegalovirus.
- 9) Encefalopatía relacionada con VIH.
- 10) Herpes simple (úlceras crónicas con duración superior a 1 mes, o bronquitis, neumonitis o esofagitis.
- 11) Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar.

- 12) Isosporiasis intestinal crónica (con duración superior a 1 mes).
- 13) Sarcoma de Kaposi.
- 14) Linfoma de Burkitt (o término equivalente).
- 15) Linfoma inmunoblástico (o término equivalente).
- 16) Linfoma primario de encéfalo.
- 17) Complejo *Mycobacterium avium* o *M. kansasii*, diseminado o extrapulmonar.
- 18) *Mycobacterium tuberculosis*, en cualquier localización (pulmonar³ o extrapulmonar).
- 19) *Mycobacterium*, otras especies o no identificadas, diseminada o extrapulmonar.
- 20) Neumonía por *Pneumocystis carinii*.
- 21) Pneumonia recurrente.³
- 22) Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
- 23) Septicemia por *Salmonella* recurrente.
- 24) Toxoplasmosis encefálica.
- 25) Síndrome caquetizante de la infección por VIH.

² Añadido en la ampliación de criterios para la definición de caso de SIDA en 1993 (CDC, 1992).

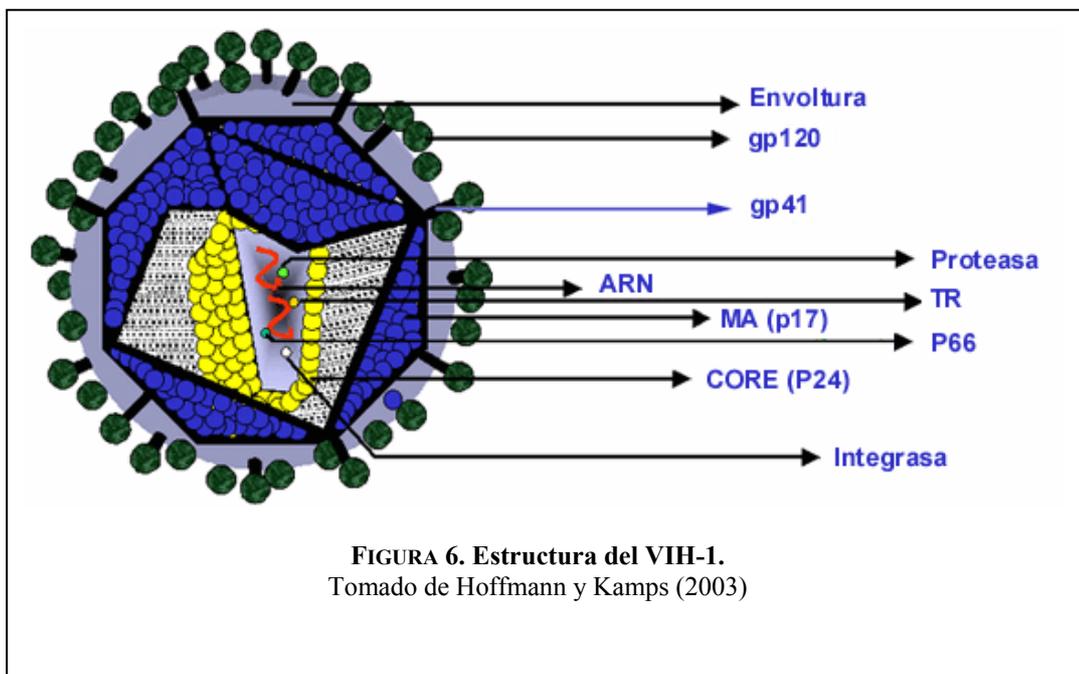
³ Añadido en la ampliación de criterios para la definición de caso de SIDA en 1993 (CDC, 1992).

1. Agente etiológico

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus humanos (retroviridae), subfamilia lentivirus. Está compuesto por dos moléculas de RNA monocatenario genómico, con una doble envoltura proteica, que contiene una ADN polimerasa que actúa como una transcriptasa inversa. Mediante este enzima, a partir del RNA monocatenario de sentido positivo del virus se produce una copia en sentido inverso de ADN bicatenario, que puede integrarse en el genoma humano.

La envoltura externa tiene una estructura icosaédrica (Figura 6) que contiene numerosas espículas formadas por las principales proteínas virales: gp120 y gp41 (HERRUZO CABRERA y cols., 2001; MADIGAN y cols., 1997^b).

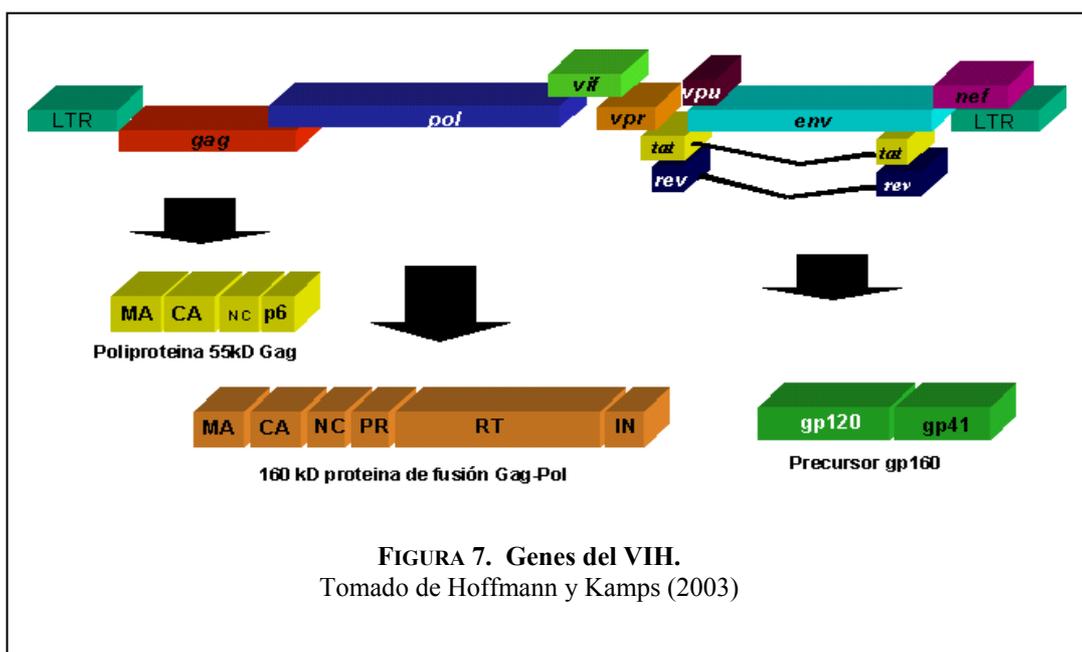
Como otros retrovirus, el VIH posee una serie de genes que codifican proteínas estructurales (Figura 7) (STRATOV y cols. 2004):



1. Gen *env*: es responsable de la síntesis de varias glucoproteínas de envoltura (gp160, gp120 y gp41), que juegan un importante papel en la unión con los receptores celulares de los linfocitos T CD4⁺.
2. Gen *gag*: proteínas p24, p17, p7 y p9, relacionadas con la composición de la nucleocápsida.
3. Gen *pol*: codifica las enzimas responsables de la transcripción inversa y la integración (proteínas p32, p66, p51 y p11).

Además, el VIH es más complejo que otros retrovirus, y contiene al menos seis genes adicionales (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, y *nef*) que codifican proteínas que regulan la expresión génica. En cada uno de los extremos de este conjunto de genes nos encontramos con una secuencia LTR (Long Terminal Repeat). La estructura común de un genoma retroviral es 5'LTR-*gag-pol-env*-LTR3', siendo estas dos regiones terminales (que no codifican ninguna proteína) el punto de conexión al DNA del huésped después de la integración (HOFFMANN y KAMPS, 2003).

Se han descrito dos tipos de virus que afectan al hombre: VIH-1 y VIH-2. El



VIH-2 se describe por primera vez en 1986 en África occidental. Ambos tipos comparten aproximadamente del 40 al 60% de homología a nivel de aminoácidos. Se ha observado similitud entre el VIH y el virus de inmunodeficiencia del chimpancé (VIS), por lo que se piensa que a lo largo de la historia se han producido transferencias de chimpancés a humanos. Aunque el VIS no se transmite de simios a humanos, debe de haberse recombinado para dar lugar al VIH.

El VIH-1 es el que está más extendido por todo el mundo y se divide en tres grupos (GURTLER y cols., 1994; SIMON y cols., 1998):

- Grupo M (mayor) responsable de la mayor parte de las infecciones en el mundo. Contiene 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K); el subtipo B es el más extendido por Europa Occidental, Estados Unidos, Canadá, Sudamérica y Australia.
- Grupo O (outlier), una forma viral relativamente rara encontrada en Camerún, Gabón, y Francia.
- Grupo N, identificado en mujeres del Camerún con SIDA.

2. Replicación viral

La infección por VIH se inicia tras la unión de la proteína gp120 a los receptores CD4⁺ de la superficie celular de los linfocitos T. Dicha unión provoca un cambio en la conformación de la proteína gp120 que permite su unión a un grupo de coreceptores; los dos más importantes para el VIH son CCR5 y CXCR4. El uso de uno, otro o ambos determina el tropismo de VIH. Cuando la unión de la proteína gp120 es completa, se modifica la estructura de la envoltura viral exponiendo la proteína gp41, la cual facilita la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la internalización del RNA en la célula infectada. La transcriptasa inversa cataliza la transcripción del genoma RNA en una doble hélice de DNA, esta es translocada al núcleo, y debido a la acción de otra enzima viral, la integrasa, se integra en parte,

aunque no completamente, en los cromosomas de la célula huésped. A partir de este momento el provirus puede quedar transcripcionalmente inactivo (latente) o expresar sus genes en diferentes niveles, hasta la producción activa de virus.

La activación celular juega un papel importante en el ciclo del VIH, y es crítica en la patogenia de la enfermedad. Para que se inicie la transcripción del DNA viral integrado en RNA o RNAm se requiere cierto grado de activación celular, dependiente de la interacción de factores virales y celulares. El RNAm viral se traslada a proteínas que sufren procesos de glicosilación, fosforilación y clivado. La partícula viral se forma por ensamblaje de las proteínas VIH, enzimas y genoma RNA en la membrana plasmática de las células: La génesis de viriones ocurre a través de regiones especializadas en la bicapa lipídica de la membrana celular llamadas *lipid rafts* (balsas de lípidos). La proteasa viral cataliza la separación de los precursores produciendo viriones maduros (BRAUNWALD y cols., 2004).

3. Desarrollo de la enfermedad

Tras la infección primaria, con algunas variaciones relacionadas con la puerta de entrada en las que intervienen de forma significativa las células dendríticas, se produce una primera fase de viremia previa al inicio de la respuesta inmunitaria y con ella la diseminación del VIH por órganos linfáticos, cerebro y otros tejidos.

La infección por VIH induce una respuesta inmunológica antiviral importante, sin embargo la replicación viral nunca se controla totalmente (BUENZ, 2004), sino que se mantiene a niveles que reflejan el equilibrio entre el control inmunitario y los fenómenos de escape viral (BAILEY y cols., 2004). La respuesta de linfocitos T citotóxicos, junto al desarrollo de anticuerpos específicos, consiguen reducir parcialmente la viremia, generalmente entre 10^4 y 10^5 copias de RNA/mL. Estos niveles se mantienen durante un periodo asintomático de unos 10 años de duración (mediana) durante el cual la replicación del VIH conduce a una destrucción progresiva

de las células T CD4⁺, provocando finalmente un colapso de la respuesta inmunitaria, tanto frente al VIH como frente a otros patógenos, y el desarrollo del SIDA. Se suman también alteraciones funcionales en los CD4⁺, pero no limitan la respuesta vigorosa y sostenida de las células B y los linfocitos T CD8⁺.

La cronificación de la infección por VIH se atribuye a la capacidad del virus para evadir el control inmunitario, proceso que se consigue mediante diversos mecanismos, en su mayor parte asociados a la aparición de mutaciones. Se pueden destacar:

1. Modificación de la estructura de la proteína de superficie, de forma que quedan enmascarados los epítomos antigénicos impidiendo su reconocimiento por los anticuerpos neutralizadores.
2. Pérdida de la respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺ específicos frente al VIH. Estas células son esenciales para la respuesta antigénica específica, tanto humoral como celular, y su infección preferente por el VIH tiene consecuencias muy negativas para el control de la replicación del VIH.
3. Secuestro de las células infectadas por el VIH en zonas inmunológicamente privilegiadas como el SNC, impidiendo su eliminación por linfocitos CD8⁺ citolíticos.
4. Formación de un reservorio de células con infección latente que no puede ser eliminado por linfocitos citolíticos específicos. Este reservorio permanece incluso cuando se administra tratamiento antirretroviral altamente efectivo y se consigue un descenso mantenido en la viremia. Los virus en estado latente no se afectan por el tratamiento y pueden generar copias virales competentes cuando aparecen señales de activación. Este es precisamente uno de los mayores obstáculos que presenta actualmente la erradicación del virus (BRAUNWALD y cols., 2004).
5. Mutaciones que permiten eludir el control por linfocitos T CD8⁺ citolíticos.

6. La proteína *nef* es un determinante importante de la patogenicidad viral. Inhibe la presentación de moléculas HLA clase I en la superficie de las células infectadas por VIH, lo que reduce la capacidad de los linfocitos T citolíticos para reconocer y destruir las células infectadas (BUENZ, 2004).

La activación del sistema inmunológico es un componente normal de la respuesta frente a un antígeno extraño. En condiciones normales se mantiene un estado de homeostasis, de forma que una vez que el antígeno es eliminado el sistema vuelve a su estado basal. En la infección por VIH, al contrario, dada la persistencia de la replicación viral el sistema inmune está crónicamente activado. Esto supone una hiperactivación de las células B (hipergammaglobulinemia), proliferación linfocítica espontánea, activación de monocitos, expresión de activadores de células T CD4⁺ y T CD8⁺, hiperplasia de los nódulos linfáticos e incremento de la secreción de citoquinas proinflamatorias. Incluso en ausencia de infección directa, las proteínas de envoltura del VIH pueden actuar sobre los receptores celulares para desarrollar potentes señales que activan el flujo de calcio, la fosforilación de proteínas que participan en señales de transducción, e incluso la apoptosis celular. La secreción de citoquinas proinflamatorias e inmunoregulatoras es al mismo tiempo una consecuencia de la activación inmune aberrante asociada a la infección por VIH y un mecanismo de propagación de esta activación.

En este proceso de activación celular además de factores endógenos intervienen factores exógenos. Otros virus como el VHS tipo 1, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus de la hepatitis B, adenovirus, etc., o microorganismos como micoplasmas o micobacterias, pueden estimular la expresión viral con efectos importantes sobre su patogenicidad.

La persistencia de la activación inmunológica tiene consecuencias graves. Desde un punto de vista virológico, aunque las células T CD4⁺ inactivas pueden infectarse, la transcripción inversa, la integración y la replicación viral son mucho

más eficientes en las células activadas. Además, la activación celular induce la expresión viral en células con infección latente.

Desde un punto de vista inmunológico, la exposición crónica del sistema inmune a un antígeno particular termina provocando la incapacidad para sostener una respuesta adecuada frente a dicho antígeno. Es más, la capacidad de respuesta frente a un amplio espectro de antígenos se ve comprometida si las células inmunocompetentes se mantienen en un estado crónico de activación. Finalmente, la activación del sistema inmunológico favorece la eliminación de células a través de su muerte programada (apoptosis), así como la secreción de citoquinas que inducen la expresión de VIH.

También los fenómenos autoinmunes, comunes en los individuos infectados por VIH, reflejan en parte una activación crónica del sistema inmune; incluyen anticuerpos frente a linfocitos, plaquetas, neutrófilos, componentes nucleares y citoplasmáticos, así como a un amplio rango de proteínas plasmáticas. Existe una reactividad cruzada entre las proteínas virales gp120 y gp41, y las moléculas MHC clase II, y se han descrito anticuerpos frente a estas últimas, que podrían provocar la destrucción de las células que expresan estas moléculas por citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

La homeostasis del sistema inmunitario está regulada por una compleja red de citoquinas inmunoreguladoras. El desarrollo de las células CD4⁺ estimuladas por antígenos y su diferenciación en células Th producirá diferentes subgrupos de citoquinas como IFN- γ , IL-2, TNF (Th1) o IL-4, IL-5, IL-13 y IL-10 (Th2) dependiendo a su vez del tipo de citoquinas responsables de la activación. Las IL-2 favorecen el desarrollo de Th1 y las IL-4 el de Th2 (SUCIU-FOCA y cols., 2003). Las células Th1 favorecen la respuesta inmune mediada por células mediante la producción de IFN- γ , mientras que la Th2 induce la síntesis de anticuerpos y la respuesta eosinofílica produciendo IL-4, IL-5 y IL-3. Además del ambiente de

citoquinas, otras variables influyen en el desarrollo de células T (ABBAS y cols., 1996; ROMAGNANI, 1997):

1. La afinidad de los receptores de células T (TCR) por los antígenos.
2. La duración de la interacción entre TCR y antígeno.
3. La coestimulación diferencial de las APCs (células presentadoras de antígenos).

Las células Tc CD8⁺ diferenciadas en células Tc funcionales adquieren la capacidad de producir proteínas citotóxicas y matar células diana que expresan el complejo péptido-MHC clase I. La generación de las células Tc CD8⁺ va a depender de la ayuda que proporcionan las T CD4⁺ a través de la interacción con células dendríticas (CD). Las células T estimuladas por antígenos expresan CD40L que interactúa con CD40, un receptor de superficie que puede activar CD (LEDERMAN y cols., 1999; CAUX y cols., 1994; CELLA y cols., 1996). Las CD activadas estimulan la expresión de coestimuladores y MHC incrementando su capacidad para estimular Tc CD8⁺.

Las citoquinas inflamatorias y productos bacterianos también pueden activar las CD e inducir el aumento de producción de IL-12, una citoquina requerida para la activación de Tc (CAUX y cols., 1994; CELLA y cols., 1996). Por tanto, lo principal para la activación y diferenciación funcional de células Th y Tc es su interacción con CD que proporcionan tanto los complejos MHC-péptidos, reconocidos por las células T (señal 1), como las moléculas coestimuladoras requeridas para una “detonación” eficiente (señal 2). La especificidad antigénica de las células T helper y citotóxicas es una característica intrínseca de la respuesta inmunológica adaptativa.

Tabla 8. Características de las citoquinas producidas por las células Th1 y Th2 en la infección por VIH.

Citoquinas producidas por células Th1:

1. IL-2: proliferación de células T.
2. IFN- γ : activación de macrófagos, incremento en la expresión de MHC, supresión células Th2.

Citoquinas producidas por células Th2:

1. IL-1: activación de células T y macrófagos.
2. IL-4: activación de células B, supresión de células Th1.
3. IL-6: crecimiento y diferenciación de células T y B.
4. IL-8: quimioquina de células T.
5. IL-10: supresión de macrófagos.
6. TNF- α : inflamación.

IFN- γ y IL-4 son citoquinas que conducen a la respuesta de Th1 y Th2, respectivamente.

Actualmente se desconoce por qué el control inmunológico de la replicación VIH es ineficiente en la mayor parte de los sujetos infectados. El VIH altera diversos mecanismos inmunológicos, incluyendo la capacidad de respuesta de las células T, la producción de citoquinas y las funciones de las células presentadoras de antígenos (APC). En los pacientes VIH⁺, los monocitos son la principal fuente de IL-10 (KUMAR y cols., 1998). El nivel de IL-10 sérica aumenta con la progresión de la enfermedad, posiblemente causando la alta susceptibilidad a infecciones oportunistas (STYLIANOU y cols., 1999). Los monocitos de pacientes VIH⁺ expresan mayores niveles de ILT4 que los de los controles no infectados. El suero de los VIH⁺ induce la estimulación de la expresión de ILT4 en los monocitos de los controles, fenómeno causado por niveles elevados de IL-10. Esto además provoca una alteración en la capacidad de desencadenar la activación y proliferación de células Th CD4⁺. Supone que IL-10 es al menos parcialmente responsable de la función alterada de APC de los monocitos en los pacientes infectados por VIH. La inhibición mediada por ILT4 de la activación de Th puede ser beneficiosa (previniendo nuevas infecciones de células T

CD4⁺), o perjudicial, alterando la respuesta inmune celular (VLAD y cols., 2003; SUCIU-FOCA y cols., 2003).

La infección por VIH progresa hasta que tras un periodo variable, el recuento de las células CD4⁺ cae por debajo de un nivel crítico (<200/ μ L) haciendo al paciente altamente susceptible a las infecciones oportunistas. En ausencia de tratamiento antirretroviral, este periodo presenta una media de 10 años, incluso con recuentos CD4⁺ extremadamente bajos. La evolución depende también de factores del huésped como la edad y dotación genética. Una parte de los pacientes infectados presentan resistencia al desarrollo de la enfermedad, permanecen asintomáticos, inmunológicamente normales a pesar de la infección prolongada por VIH, tienen una cantidad de CD4⁺ normal (600/ μ L) y niveles bajos de RNA vírico en plasma, por lo que reciben el nombre de personas infectadas pero no progresoras (en inglés, *long-term non-progressors*, LTNP). Un 25-30% de estos sujetos tienen mutaciones homocigóticas en el correceptor del VIH-1, CCRT y CCR2 que afectan a la adhesión del virus y por tanto disminuye su efectividad (HUANG y cols., 1996). En otros LTNP, la replicación del virus se ve reducida a niveles indetectables debido a mutaciones de los genes virales que alteran su capacidad de replicación (RODES y cols., 2004; SALVI y cols., 1998). Otros factores que modifican la progresión de la enfermedad incluyen ciertos haplotipos del Complejo Mayor de Compatibilidad, concretamente los haplotipos B27, B57 y B51, fuertemente asociados con la ausencia de progresión a largo plazo, quizás debido a una presentación eficiente de los epítomos inmunodominantes y la consecuente respuesta humoral (KLEIN y cols., 1994; MIGUELES y cols., 2001). Por último, los linfocitos Tc CD8⁺ específicos pueden retrasar la progresión (CECILIA y cols., 1999).

A nivel molecular se ha demostrado la importancia de la apoptosis mitocondrial en este fenómeno. La apoptosis espontánea es mayor en pacientes con infección por VIH progresiva que en los LTNP. Los hallazgos recientes indican que el grado de apoptosis se relaciona inversamente con la disminución de las células T

CD4⁺, sugiriendo que la apoptosis es un fenómeno necesario y suficiente para el desarrollo de la inmunodeficiencia (BUENZ, 2004)

El uso de la terapia antirretroviral dio lugar a una inhibición de la replicación viral, que provocó un importante optimismo sobre la capacidad para curar la infección (PERELSON y cols., 1997). Tras varios años de viremia indetectable, la interrupción del tratamiento provoca un rebote en la replicación del virus (WONG y cols., 1997; SHARKEY y cols., 2000). Recientemente se ha comprobado la existencia de una subpoblación de linfocitos T que expresa el marcador fenotípico de linfocitos T memoria y que contienen DNA viral (FINZI y cols., 1999, 1997; JANEWAY y cols., 2001). Estas células infectadas son metabólicamente inactivas, no transcriben DNA viral, y por tanto son resistentes a los agentes antirretrovirales, pero proporcionan un reservorio que permite la supervivencia viral.

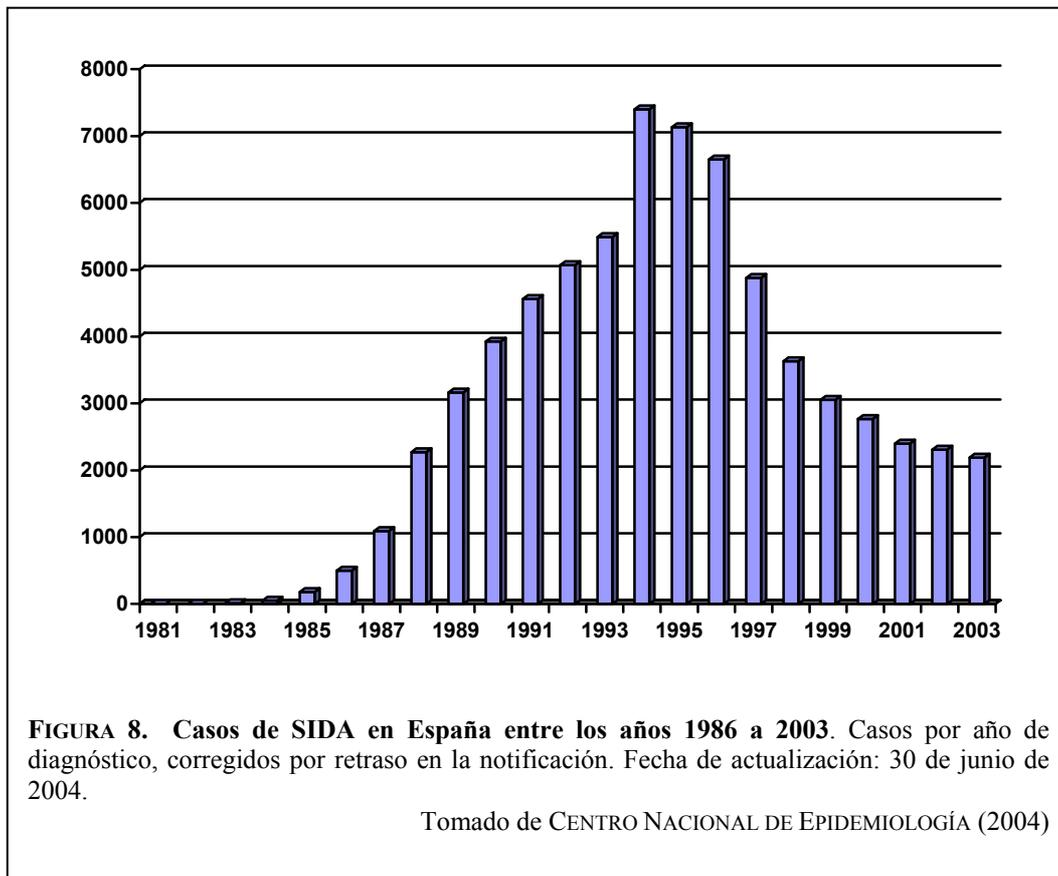
La integración del genoma del VIH-1 en el DNA de las células infectadas se ha detectado en células T CD4⁺ y macrófagos (CHUN y cols., 1997).

Epidemiología del SIDA

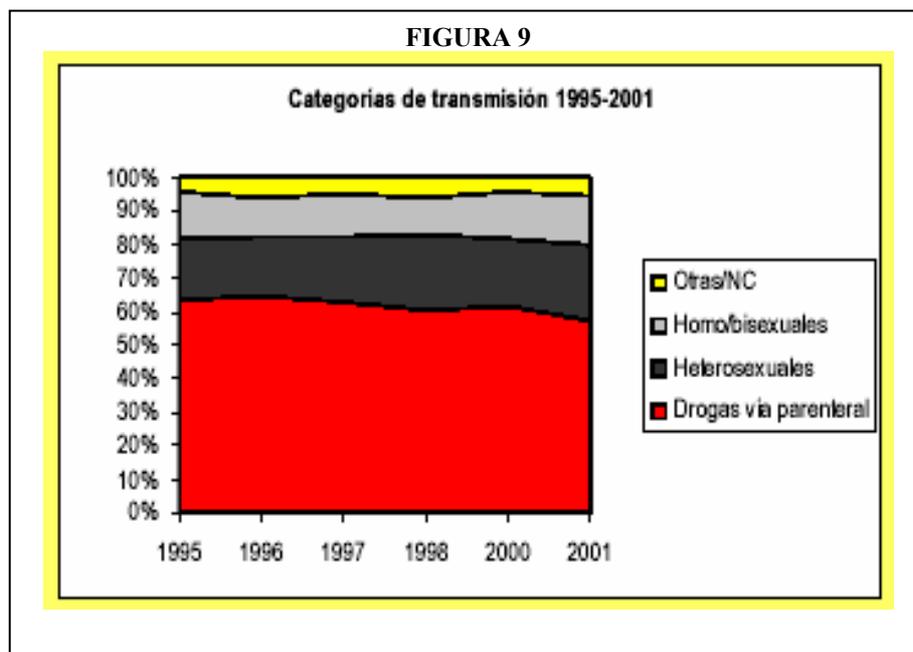
La incidencia anual de casos de SIDA en España fue máxima en 1994. A partir de 1996, se extiende la utilización de tratamientos antirretrovirales de alta eficacia, observándose una caída del 28% en la incidencia de SIDA entre 1996 y 1997. Esta tendencia ha continuado en los años siguientes, hasta la actualidad, pero con un menor ritmo de descenso (Figura 8).

En España, el mecanismo de transmisión fundamental ha sido el uso de drogas por vía parenteral. En los primeros años de la epidemia le seguía en frecuencia la

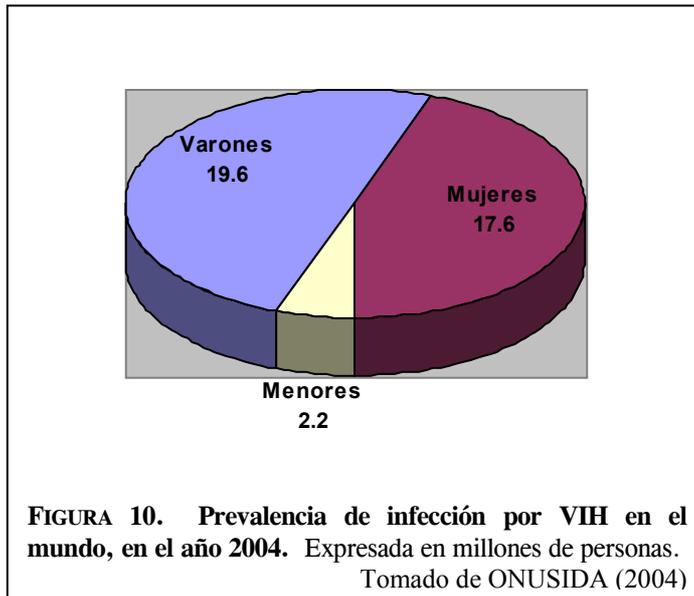
transmisión homo/bisexual y a continuación la heterosexual. La evolución de casos de SIDA atribuidos a cada uno de estos mecanismos de transmisión (Figura 9), indica claramente como en el momento actual, aproximadamente la mitad de los casos diagnosticados contrajeron la infección por compartir material de inyección de drogas, y el segundo lugar en frecuencia lo ocupa el mecanismo de transmisión heterosexual.



Al analizar la información disponible destaca el aumento significativo en el porcentaje de nuevos diagnósticos realizados en personas nacidas en otros países. Los inmigrantes que proceden de países con una importante epidemia de VIH (África subsahariana) muestran una gran proporción de infectados y todos los datos sugieren que los inmigrantes adquieren la infección por VIH en sus países de origen. La mayoría de los inmigrantes no saben que están infectados hasta que empiezan a tener

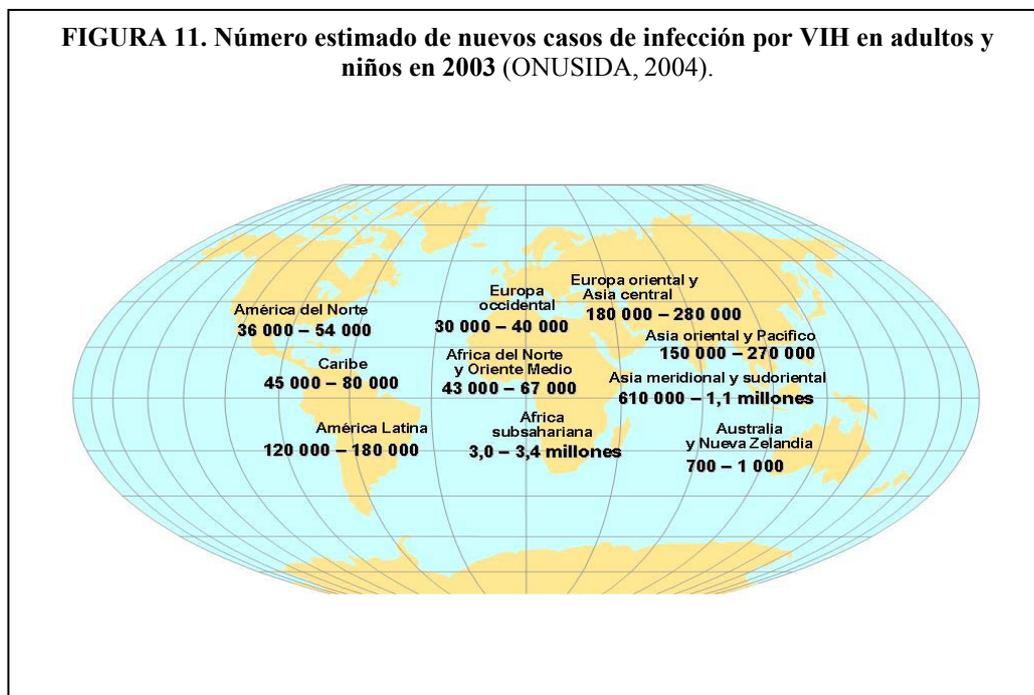


síntomas. Una situación similar se encuentra en otros países del entorno Europeo: en el Reino Unido, tres cuartas partes de las infecciones por VIH en heterosexuales diagnosticadas en el 2002 fueron adquiridas en África. En Suecia, más del 80% de las infecciones por VIH registradas fueron adquiridas por contacto heterosexual en países extranjeros (B.E.S., 2003; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA, 2004; ONUSIDA, 2004).



En lo referente a la situación mundial, se estima que en el año 2004 vivían en el mundo 39.4 millones de personas infectadas por VIH, de las cuales 37.2 millones son adultos, de ellas 17.6 mujeres, y 2.2 millones son menores de 15 años (Figura 10). Durante este año se han producido 4.9 millones de casos

nuevos de infección y 3.1 millones de muertes, 2.6 millones en adultos y 510 000 en menores de 15 años (B.E.S., 2003; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA, 2004).



La epidemia no es homogénea, algunos países están más afectados que otros e incluso en un mismo país, existen grandes variaciones en las tasas de infección entre

sus provincias, distritos, etc. La Figura 11 recoge la situación en las distintas regiones mundiales. Puede comprobarse como la incidencia es mucho menor en los países occidentales en relación al resto del mundo, y destaca la situación especialmente dramática del África subsahariana.

TABLA 9. Estadísticas y características de la infección por VIH y SIDA, durante 2002 y 2004 en diversas partes del mundo

AÑO	ÁFRICA SUBSAHARIANA		CARIBE		ASIA		EUROPA ORIENTAL Y ASIA CENTRAL	
	2002	2004	2002	2004	2002	2004	2002	2004
Personas infectadas	24.4	25.4	0.42	0.44	7.2	8.2	1.0	1.4
Mujeres infectadas	12.8	13.3	0.19	0.21	1.9	2.3	0.33	0.49
Nuevos casos	2.9	3.1	0.052	0.053	1.0	1.2	0.19	0.21
Prevalencia (%)	7.5	7.4	2.3	2.3	0.4	0.4	0.6	0.8
Muertes por SIDA	2.1	2.3	0.033	0.036	0.47	0.54	0.04	0.06

Los datos están expresados en millones, excepto la prevalencia que se expresa en valor porcentual.

TABLA 9 (continuación). Estadísticas y características de la infección por VIH y SIDA, durante 2002 y 2004 en diversas partes del mundo

AÑO	AMÉRICA LATINA		OCEANÍA		ORIENTE MEDIO Y ÁFRICA DEL NORTE		AMÉRICA DEL NORTE Y EUROPA OCCIDENTAL	
	2002	2004	2002	2004	2002	2004	2002	2004
Personas infectadas	1.5	1.7	0.028	0.035	0.43	0.54	1.6	1.6
Mujeres infectadas	0.52	0.61	0.005	0.007	0.20	0.25	0.39	0.42
Nuevos casos	0.19	0.24	0.003	0.005	0.073	0.092	0.062	0.064
Prevalencia (%)	0.6	0.6	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4
Muertes por SIDA	0.074	0.095	0.0005	0.0007	0.020	0.028	0.022	0.023

Los datos están expresados en millones, excepto la prevalencia que se expresa en valor porcentual.

El porcentaje de mujeres infectadas es creciente (Tabla 9). En todo el mundo, algo menos de la mitad de todas las personas que viven con el VIH son mujeres, pero estas constituyen el 52 % de todas las personas infectadas en el África subsahariana, porcentaje que aumenta hasta el 76 % entre los 15 y 24 años de edad. En el resto de las regiones las mujeres y niñas representan una proporción en alza de las personas que viven con VIH.

El uso de tratamientos antirretrovirales ha mejorado el sistema inmune por lo que se ha producido una disminución de las enfermedades indicativas del SIDA. Las más frecuentes son, de acuerdo con los datos de 2004, tuberculosis diseminada o extrapulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, candidiasis esofágica y tuberculosis pulmonar.

Con la aparición del tratamiento antirretroviral, la incidencia y las muertes por SIDA disminuyeron fuertemente en la mitad de 1990. Los enfermos bajo tratamiento con antirretrovirales muestran una mayor calidad de vida y supervivencia. Estos tratamientos tienen un beneficio económico añadido, ya que aumenta la productividad laboral de los pacientes con VIH/SIDA, y disminuye la incidencia de infecciones oportunistas y su coste asociado. La evolución del coste total de la atención médica a estos pacientes muestra una reducción importante, pasando de 2000 €/mes en 1996, a menos de 1500 €/mes actualmente. Aunque la vulnerabilidad y el coste del SIDA están mejorando gracias a los avances terapéuticos, son muchos los retos actualmente planteados derivados especialmente de la desigual disponibilidad de los recursos. A pesar de las mejoras, la cobertura sigue siendo desigual. En países subdesarrollados, 9 de cada 10 personas que necesitan tratamiento no lo están recibiendo. El tratamiento del SIDA solamente será económicamente accesible y sostenible si la prevención de la infección por VIH es eficaz (ONUSIDA, 2004).

Vigilancia epidemiológica

Conocer el número de casos nuevos de VIH diagnosticados, sería un excelente indicador para el control de la situación. La vigilancia epidemiológica es esencial para detectar las señales de alarma de la expansión del VIH y además para el control de las intervenciones. Existen factores importantes como son las enfermedades de transmisión sexual, drogadicciones o el tratamiento antirretroviral que influyen en la transmisión del VIH junto con otros muchos de carácter demográfico, socio-económico, etc. Para la prevención, cuidados y control de la infección por VIH, lo

más importante es el tratamiento antirretroviral y el diagnóstico precoz. Una gran proporción de gente infectada por VIH no conoce su estado, estas personas no se van a beneficiar en nada del tratamiento y van a seguir transmitiendo el virus entre sus contactos (HAMERS y DOWNS, 2004).

Cuando hablamos de caso de SIDA nos estamos refiriendo a una consecuencia tardía de la infección por VIH, que no refleja la incidencia actual de nuevas infecciones por este virus. La incidencia de VIH es un buen indicador para ver las intervenciones que se deben realizar para el control del SIDA (prevención, diagnóstico precoz y tratamiento). Actualmente la incidencia de SIDA en España es elevada comparada con otros países de Europa, así que habrá que potenciar la prevención, y lo más importante, el diagnóstico precoz del VIH, ya que puede conducir el curso de la epidemia.

El Registro de infecciones por VIH empezó a partir del año 2000 en varios países de Europa occidental (Portugal, Países Bajos, Francia, Italia). En España, el Registro Nacional de SIDA, elaborado por el Centro Nacional de Epidemiología dependiente del Instituto de Salud Carlos III, es una actividad en la que participan los Registros de SIDA de las Comunidades Autónomas y el Registro de SIDA de la Sanidad Penitenciaria, y cuyos resultados se publican periódicamente en el Boletín Epidemiológico Semanal.

De acuerdo con los datos del Registro Nacional la incidencia anual de SIDA fue ascendente hasta mediados de los noventa, en 1994 se produjo el punto de máxima incidencia coincidiendo con el repunte que provocó la ampliación de la definición de caso de SIDA. Desde 1996, el tratamiento antirretroviral de gran actividad ha tenido un gran impacto en la calidad de vida y la supervivencia de las personas infectadas, logrando descensos muy importantes en la incidencia de SIDA y en la mortalidad asociada al VIH. Entre 1996 y 2003 los casos de SIDA han registrado descensos mayores del 65%. No obstante, mientras entre 1996 y 1999 se registró un descenso

del 54%, en el último cuatrienio (2000-2003) se ha detectado una tendencia a la estabilización y un descenso global del 20%, que fue mayor en mujeres (29%), que en hombres (18%). Hasta el 30 de junio de 2004 se estima que en 2003 se diagnosticaron 2190 casos nuevos de SIDA, lo que supone un leve descenso (5.2%) en la incidencia respecto a 2002. El impacto de los nuevos tratamientos antirretrovirales ha tenido efectos en todas las categorías de transmisión, produciendo descensos importantes en la incidencia de SIDA. En los últimos años esta tendencia se ha suavizado en todas ellas, y en las categorías de hombres homo/bisexuales y de transmisión heterosexual la incidencia permanece estable. Los casos nuevos de SIDA diagnosticados en 2003 reflejan el perfil de las personas que viven con el VIH y de forma más específica las características de aquellas en las que la infección VIH ha alcanzado etapas de inmunodeficiencia más avanzada. El patrón epidemiológico y sociodemográfico de estas personas puede diferir mucho respecto al de aquellas con infección reciente por el VIH. Hasta la fecha se ha recibido la notificación de 1888 casos diagnosticados en 2003, que suponen el 86% de los casos que se estima que habrá cuando se complete la notificación. Entre ellos el 79.7% fueron hombres y la edad media al diagnóstico de SIDA ascendió a 40 años. El 49% de las personas que desarrollaron SIDA en 2003 habían contraído la infección por compartir material para la inyección de drogas, lo que pone de manifiesto el peso importante que tienen todavía los UDVP dentro del conjunto de personas que viven infectadas por el VIH. El segundo lugar, ya a distancia, es ocupado por los casos atribuidos a transmisión heterosexual (27.9%), y le sigue la categoría de hombres homo/bisexuales (15.1%). Los casos de transmisión madre-hijo sólo suponen el 0.3% del total. La categoría de transmisión más frecuente entre los hombres continua siendo la de UDVP con un 50.5% de los casos, seguida de la transmisión heterosexual (22.2%). Sin embargo en las mujeres, los casos atribuidos a transmisión heterosexual por primera vez han superado a los diagnosticados en mujeres UDVP, alcanzando una proporción de 50.2%, frente a 43% respectivamente. En 2003 la razón hombre-mujer entre los casos atribuidos a transmisión heterosexual fue de 1.7, mientras que en los casos entre UDVP ascendió a 4.6 (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA, 2004).

Los jóvenes de edades comprendidas entre los 15 y los 24 años, representan la mitad de los nuevos casos del VIH del mundo, pero a su vez una esperanza de cambiar el rumbo de esta epidemia, al disminuir su prevalencia de manera más importante en este grupo etario. Por esta razón es tan importante la elaboración de buenos programas y estrategias de prevención, sistemas de salud y programas de educación (CARPIO, 2001).

En todos estos datos hay que tener en cuenta el cambio que se dio en la definición de SIDA en el año 1994, aumentando el número de casos ya que se incluyeron 3 nuevas enfermedades, 2 de ellas se presentan en los estadios tempranos de la enfermedad: tuberculosis pulmonar y neumonías bacterianas.

Prevención primaria de la infección por VIH

La prevención primaria tiene el objetivo principal de evitar la infección del VIH a diferencia de la prevención secundaria que trata de modificar la historia natural de la infección para que tenga una progresión lenta.

La educación sanitaria, consejos sobre hábitos de riesgo y modificación de comportamientos de riesgo, son las claves de la estrategia de prevención. Asociada a la educación sanitaria se recomienda el cribado voluntario amplio de individuos con prácticas de riesgo, al que hay que sumar el consejo a los individuos infectados. La información obtenida por estos medios sirve de base para los programas de modificación del comportamiento, tanto dirigidos a individuos potencialmente infectados como a la población no infectada con prácticas de riesgo.

Cuando la prevalencia es baja, la prevención focalizada en grupos diana específicos (profesionales del sexo y sus clientes, consumidores de drogas intravenosas, varones que mantienen relaciones sexuales con otros hombres), puede mantener la infección por VIH en la población general en niveles bajos. En el caso de que la prevalencia sea alta, para cambiar el rumbo de la epidemia se requieren estrategias amplias para todos los segmentos de la sociedad.

La prevención es un pilar importantísimo de la respuesta al SIDA, pero el problema es que sólo menos de una quinta parte de las personas que lo necesitan a nivel mundial tienen acceso a servicios de prevención. La expansión de programas de prevención primaria, junto con la terapia antirretroviral, aporta una de las mayores esperanzas en la lucha contra el SIDA, estimándose un impacto importante en los niveles de infección por VIH, evitándose 29 millones de los 45 millones de nuevas infecciones que se prevén para el próximo decenio. La meta para el 2005 es la disminución de un 25 % en la prevalencia de infección por VIH entre los jóvenes de 15-24 años y en un 20 % la proporción de lactantes infectados por el virus. No obstante, aún existen países sin programas preventivos como es el caso de África subsahariana, por lo que hay que implantarlos de la manera más rápida posible. La prevención de la epidemia entre las mujeres y niñas requiere unos esfuerzos mayores (DHHS, 2004).

Los elementos esenciales para una prevención integral del VIH destacados por ONUSIDA (2004), son los siguientes:

- Educación y sensibilización sobre el SIDA.
- Programas de cambio de comportamiento en jóvenes, sujetos con mayor riesgo de exposición al VIH y personas ya infectadas.
- Promoción del uso de preservativos masculinos y femeninos.
- Prevención y tratamiento de infecciones de transmisión sexual.

-
- Asesoramiento y pruebas voluntarias.
 - Prevención primaria entre embarazadas y prevención de la transmisión materno infantil.
 - Programas de reducción del daño para consumidores de drogas intravenosas.
 - Medidas para proteger la seguridad de los suministros sanguíneos.
 - Control de las infecciones (inyecciones médicas seguras, profilaxis postexposición).
 - Educación de la comunidad para contrarrestar el estigma y la discriminación.
 - Reducción de la vulnerabilidad mediante cambios sociales, legislativos y económicos.

Todas las intervenciones propuestas son de prevención primaria excepto el asesoramiento y pruebas voluntarias, incluidas con el fin de reforzar la educación sanitaria y de esta manera interrumpir el mecanismo de transmisión. La detección precoz del estado de la infección ofrece la posibilidad de evitar la progresión de la misma hasta un SIDA constituido mediante el tratamiento con antirretrovirales, retrasa la progresión de la enfermedad, lo que permite realizar una prevención secundaria, pero también contribuye a la prevención primaria puesto que disminuye la viremia y con ello la infectividad de los sujetos (ONUSIDA, 2004).

Vacunas frente a VIH

Se piensa que la única manera de frenar la epidemia sería con la obtención de una vacuna eficaz contra el VIH, aunque esto es de gran complejidad por diversas razones entre las que se destacan:

- Elevada variabilidad genética del VIH.
- Replicación rápida del virus.
- Propagación de la infección mediante partículas VIH libres o intracelulares.
- Necesidad de inducir una inmunidad efectiva a nivel de mucosas.
- Ausencia de correlatos precisos de inmunidad protectora frente a la infección por VIH.

Los resultados de los distintos ensayos realizados hasta el momento resaltan la importancia de la inmunidad mediada por células CD8⁺. Se han probado proteínas de la envoltura viral gp120, vectores virales o bacterianos que portan genes de VIH capaces de sintetizar proteínas virales, DNA desnudo, péptidos de VIH, partículas virales completas inactivadas e incluso virus de VIH atenuados.

Las alternativas aparentemente más prometedoras incluyen una combinación de estrategias en las que se asocia un vector viral (canarypox) que expresa diversos epitopos de VIH junto a la proteína gp120. Inducen anticuerpos neutralizantes en casi todos los receptores y aproximadamente en el 30 % de ellos también una respuestas de células T citolíticas VIH específicas (I.C.A.S.O., 2000).

Aunque tengamos una vacuna eficaz, va a ser inútil en aquellas personas que tienen muy avanzada la enfermedad, con el sistema inmunitario casi nulo, por eso mientras aparece una vacuna eficaz, el mejor tratamiento que existe es la prevención (MADIGAN y cols., 1997^b).

Tratamiento de la infección por VIH

El tratamiento de los pacientes infectados por VIH requiere el uso de terapia antirretroviral para controlar la progresión de la infección y una serie de intervenciones preventivas o terapéuticas dirigidas a evitar o controlar las enfermedades intercurrentes. En primer lugar, tras el diagnóstico de infección por VIH debe analizarse la extensión de la enfermedad, específicamente es necesario valorar el recuento de células T CD4⁺ y la carga viral. No entramos aquí en el diagnóstico precoz y prevención de infecciones oportunistas, en la educación sanitaria necesaria para enfrentar la enfermedad y contribuir a la prevención o en el apoyo social que requerirá el paciente a corto, medio o largo plazo. Tampoco se van a tratar las dificultades de acceso al tratamiento existentes actualmente en países en desarrollo que constituyen el principal obstáculo para la contención de la epidemia.

La piedra angular del tratamiento es hoy por hoy la terapia antirretroviral combinada [*High Activity AntiRetroviral Therapy* (HAART)]. No obstante, a pesar de la alta eficacia de la terapia combinada en cuanto a mantener niveles indetectables de RNA viral en plasma, incluso durante períodos prolongados no se consigue eliminar la infección (CHUN y cols., 1997; FINZI cols., 1999). El objetivo del tratamiento es suprimir la replicación viral y mantener el funcionamiento del sistema inmunológico, de esta manera se consigue reducir la morbilidad y mortalidad asociada y mejorar la calidad de vida.

Los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la infección por VIH pueden agruparse en tres categorías (FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005):

- 1) *Inhibidores de la transcriptasa inversa*. En este grupo se integran los primeros antiretrovirales ensayados. Se distinguen dos tipos: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), e inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN), cuyos efectos adversos se muestran en las Tablas 10 y 11.

Todos ellos bloquean la síntesis de RNA-dependiente del DNA a nivel de la retrotranscriptasa. Los ITINN son bastante específicos frente a la enzima viral, mientras que por el contrario los análogos de nucleósidos actúan por competición con el sustrato e inhiben diversas reacciones de polimerización del DNA, por lo que se asocian a mayor frecuencia de efectos adversos, entre ellos lesiones mitocondriales que ocasionan esteatosis hepática, acidosis láctica, neuropatía periférica y pancreatitis.

Tabla 10. Efectos adversos de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos.

(FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005)

ZIDOVUDINA	Anemia, granulocitopenia, miopatía, acidosis láctica, hepatomegalia con esteatosis, cefalea, náuseas.
ABACAVIR	Hipersensibilidad, fiebre, rash, náuseas, vómitos, pérdida de apetito ó fatiga.
LAMIVUDINA	Neuropatía periférica, pancreatitis, acidosis láctica, hepatomegalia con esteatosis, debilidad neuromuscular, lipodistrofia.
ESTAVUDINA	“
EMTRICITABINA	“
TENOFOVIR	Toxicidad renal.
DIDANOSINA	Pancreatitis, neuropatía periférica, anormalidades en la función del hígado, acidosis láctica, hepatomegalía con esteatosis.
ZALCITABINA	Neuropatía periférica, pancreatitis, acidosis láctica, hepatomegalía con esteatosis, úlceras orales.

Uno de los problemas más habituales detectados tras la extensión del uso de la terapia antiretroviral combinada es el síndrome de lipodistrofia (hiperlipemia, intolerancia hidrocarbonada y redistribución del tejido graso). En general no deben utilizarse como monoterapia por la elevada frecuencia de aparición de resistencias.

TABLA 11. Efectos adversos de inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos.

(FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005)

DELAVIRDINA	Rash en piel, hepatotoxicidad.
EFAVIRENZ	Rash, test de la función hepática elevada.
NEVIRAPINA	Erupción cutánea grave, enfermedad del hígado, dolor de estómago, garganta y cabeza, úlceras en la boca, náuseas y diarrea.

- 2) *Inhibidores de la proteasa*: Ésta es un enzima específica del VIH necesaria para fragmentar las cadenas proteicas sintetizadas en péptidos funcionales y así completar la replicación viral. Los inhibidores de la proteasa impiden la fragmentación de estas proteínas y así producen viriones defectuosos. No evitan la destrucción de la célula infectada, pero si la infección de nuevas células (Tabla 12).

Utilizados en combinación con los inhibidores de la transcriptasa inversa pueden reducir los niveles de replicación viral por debajo de 50 copias/mL durante un mínimo de 5 años. Cuando se utilizan como monoterapia rápidamente aparecen resistencias debidas a diferentes tipos de mutaciones, por lo que deben utilizarse siempre en combinación con otros agentes.

Tabla 12. Efectos adversos de inhibidores de la proteasa.
(FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005)

AMPRENAVIR	Náuseas, vómitos, diarrea, rash, parestesia oral, test de función hepática elevada, hiperglicemia, redistribución de la grasa, anormalidades lipídicas.
FOSAMPRENAVIR	“
ATAZANAVIR	Hiperbilirrubinemia, náuseas, vómitos, hiperglicemia, mal distribución de la grasa.
INDINAVIR	Nefrolitiasis, hiperbilirrubinemia, hiperglicemia, redistribución de la grasa, anormalidades lipídicas.
RITONAVIR	Náuseas, dolor abdominal, hiperglicemia, redistribución de la grasa, anormalidades lipídicas.
LOPINAVER/RITONAVIR	Diarrea, hiperglicemia, redistribución de la grasa, anormalidades lipídicas.
NELFINAVIR	“
SAQUINAVIR	Diarrea, náuseas, dolor de cabeza, redistribución de la grasa, anormalidades lipídicas.

3) *Inhibidores de la entrada del virus en la célula:* Entre ellos destacan los inhibidores de la fusión (enfurtivide) que bloquean la entrada de VIH-1 dentro de las células huésped al interferir en la fusión de la célula-virus (Tabla 13). Actualmente se estudian agentes que actúan interfiriendo con la unión del VIH a sus receptores o co-receptores.

Tabla 13. Efectos adversos de inhibidores de la fusión.
(FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005)

ENFUVIRTIDE	Reacciones de hipersensibilidad, aumento de la proporción de neumonía bacteriana.
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------

Dado que el tratamiento debe plantearse a largo plazo y no está exento de efectos adversos, debe valorarse cuidadosamente su indicación. En general, se aconseja el tratamiento inicial de los pacientes con síndrome agudo de infección por VIH, y de los casos con infección sintomática (FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005). En pacientes con infección crónica debe iniciarse el tratamiento antes de que el recuento de CD4⁺ caiga por debajo de 200 células CD4⁺/μL. Algunos clínicos consideran que se deben tratar pacientes con recuentos superiores a 350 CD4⁺/μL cuando la viremia es superior a 100 000 copias/mL (DHHS, 2004).

Tabla 14. Indicaciones para iniciar el tratamiento antirretroviral en pacientes con infección crónica por el VIH (DHHS, 2004).

Situación clínica	Células CD4 ⁺ /μL	Carga viral (copias/mL)	Recomendaciones
Sintomática (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA)	Cualquier valor	Cualquier valor	Tratar
Asintomática, SIDA (AI)	< 200	Cualquier valor	Tratar
Asintomática (BII)	> 200 pero < 350	Cualquier valor	Ofrecer tratamiento; valorar pros y contras
Asintomática (CII)	< 350	> 55 000	Iniciar tratamiento
Asintomática (DII)	> 350	< 55 000	Se recomienda posponer el tratamiento y monitorizar el recuento de CD4 ⁺

Fuerza de la recomendación: A: Fuerte; B: Moderada; C: Opcional; D: Usualmente no debe ofrecerse; E: No debería ofrecerse.

Calidad de la Evidencia: I Al menos un ensayo clínico aleatorizado con resultados clínicos; II: Ensayos clínicos con resultados de laboratorio; III: Opinión de Expertos.

Tampoco existe acuerdo unánime sobre el régimen farmacológico de elección para iniciar el tratamiento. Deben considerarse las preferencias del paciente y del

médico y las comorbilidades asociadas. Como norma general, el régimen inicial debe contener dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos a los que se añade bien un no análogo de nucleósidos o bien un inhibidor de la proteasa (FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005; DHHS, 2004). Algunos fármacos no deben combinarse porque son excesivamente similares (lamivudina y emtricitabina), otros porque tienen toxicidad aditiva o sinérgica (estavudina más didanosina) o por presentar interacciones intracelulares que reducen su actividad intraviral (zidovudina y estavudina) (DHHS, 2004).

Tras el inicio de la terapia los niveles de viremia deben reducirse 10 veces (1 log) en 1 a 2 meses, o descender a menos de 50 copias/ml. Al mismo tiempo debe aumentar el recuento de células T CD4⁺ en 100 – 150 células/ μ L (KAUFMANN y cols., 2003). Algunos clínicos consideran que el tratamiento debe modificarse cuando no se alcanza este objetivo, otras razones para el cambio incluyen el descenso persistente de la disminución de células CD4⁺, el deterioro clínico o la toxicidad.

El seguimiento del tratamiento implica la monitorización de los niveles plasmáticos de RNA-viral y el recuento de células CD4⁺. El recuento de linfocitos T CD4⁺ es el principal indicador clínico de inmunocompetencia en pacientes con infección por VIH, el mejor predictor de la progresión de la infección y la supervivencia, y el parámetro esencial para la decisión de iniciar el tratamiento antiretroviral.

El RNA-VIH plasmático (carga viral) se valora también en la decisión de iniciar el tratamiento, pero su valor es fundamental para evaluar la respuesta al tratamiento: debe medirse inmediatamente antes de iniciarlo, 2-8 semanas tras el inicio del tratamiento o la indicación de cambios terapéuticos y cada 3 a 4 meses cuando se consigue estabilizar la infección. Cuando la respuesta no es la adecuada deben valorarse otras variables como la falta de cumplimiento terapéutico, alteraciones en la absorción o biodisponibilidad de los principios activos o interacciones entre

ellas. En estos casos también puede ser de utilidad el control de resistencias. (DHHS, 2004; FAUCI y CLIFFORD LANE, 2005).

Toxicidad del tratamiento antirretroviral

La toxicidad hepática se ha descrito para todas las familias de fármacos antirretrovirales, aunque su incidencia y mecanismos patogénicos son diferentes de unos fármacos a otros, y es mayor en pacientes coinfectados por el virus de la Hepatitis B y C (DIETERICH y cols., 2004). Un buen indicador de la toxicidad hepática grave es la aminotransferasa ALT, (anteriormente llamada GPT) (PAESA y cols., 1998; ENA y cols., 2003; FONQUERNIE y cols., 2004). Las causas exactas de la elevación de los niveles de ALT en plasma son complejas, y en muchos casos, no bien conocidas (DIETERICH, 2003; MERA VI GLIA y cols., 2004).

Otro marcador de toxicidad ampliamente utilizado es la enzima creatinfosfokinasa (CPK), los niveles séricos aumentan cuando se produce una lesión en el corazón, cerebro o músculo, por lo que su alteración puede indicar lesiones de estos órganos: neuropatías, mialgias, debilidad muscular, etc. (SIMPSON y cols., 1998; ROEDLING y cols., 2004).

Otros fármacos de nuevo desarrollo

En distintas fases de desarrollo se encuentran nuevos análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa o de la fusión, inhibidores de la integrasa antagonistas de la proteína gp120 o de los co-receptores de las células CD4⁺ -inhiben la interacción del complejo gp120-CD4⁺ con el co-receptor (CCR5 o CXCR4)- o ácidos nucleicos antisentido. Se proponen también terapias inmunológicas como el interferón alfa, transplantes de médula ósea o transfusión de linfocitos genéticamente modificados.

Resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales

El virus del SIDA puede presentar resistencia a los fármacos que constituyen el tratamiento frente a esta enfermedad, el virus sufre una reducción de la susceptibilidad. La observación de la resistencia de los virus frente a varios fármacos puede realizarse mediante ensayos fenotípicos y genotípicos.

El mecanismo de resistencia puede aparecer debido a:

- **Mutaciones:** El virus RNA no tiene un mecanismo que detecte los errores y los corrija. La transcriptasa inversa comete un error por cada 10000 bases copiadas. Se generan 10 billones de partículas VIH cada día y cada genoma contiene una mutación.
- **Recombinación:** cambio de material genético (RNA) o unión de los materiales genéticos de dos virus que infectan una misma célula.
- **Selección y amplificación:** Sobreviven las partículas virales resistentes al tratamiento, dando lugar a una amplificación del virus.

La resistencia a un inhibidor de la proteasa se debe a la aparición de la acumulación de mutaciones en el sitio activo del enzima, al contrario que ocurre con los inhibidores de la transcriptasa inversa que sólo aparecen por una sola mutación. La acumulación de mutaciones además tiene el inconveniente de que puede dar resistencia a diferentes fármacos, y en algunos casos (ampinavir y lopinavir), es habitual encontrar resistencias cruzadas (PRADO y cols., 2002).

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, este trabajo se inició mediante la formulación previa de la hipótesis en la que se planteaba que podía existir una asociación entre los niveles de Hsp70 y el estado viroinmunológico en los enfermos VIH positivos. Si se comprueba esta asociación, pueden surgir potenciales implicaciones pronósticas y terapéuticas.

El objetivo de este estudio ha sido identificar y cuantificar la posible asociación existente entre el estado viroinmunológico de los pacientes VIH y los niveles de la proteína de estrés Hsp70.

Este objetivo general lo podemos dividir en varios objetivos específicos:

5. Identificar las diferencias en los niveles de Hsp70 entre grupos de enfermos VIH positivos en diferente estadio viroinmunológico.
6. Estudiar la relación de los principales parámetros bioquímicos y viroinmunológicos, sexo y tratamiento antirretroviral con las concentraciones de Hsp70.
7. Analizar la variación temporal de los niveles de Hsp70 en instantes anteriores y posteriores al fracaso virológico.
8. Valorar la utilidad de las concentraciones de Hsp70 como biomarcador de evolución clínica, virológica e inmunológica de los pacientes.

Material y métodos

Selección de los casos

Diseño

Estudio de casos longitudinal retrospectivo.

Ámbito

Unidad de infecciosos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Se trata de un hospital terciario, que presta cobertura sanitaria al área sur de la provincia, con una población de referencia estimada de unos 298 091 habitantes. La Unidad de Infecciosos consta de un área de hospitalización (10 camas) y un área de consultas externas. Durante el año 2002 atendió un total de 295 ingresos, con una estancia media de 8.7 días y un índice de ocupación del 68 %. En el área de consultas externas se atendieron un total de 681 consultas de primera vez y 3964 revisiones. El hospital de día suministró 1701 terapias VIH.

Período de estudio

Los datos se recogieron retrospectivamente para pacientes atendidos entre el 1 de enero de 1999 y el 31 de diciembre de 2002. Dicho periodo está subdividido en dos periodos:

- Período de inclusión de pacientes: comprendido entre el 1 de Enero de 1999 hasta el 31 de Diciembre de 2001.
- Período de seguimiento: comprendido entre el 1 de enero de 1999 hasta el 31 de Diciembre de 2002.

Poblaciones de estudio

1. *Población de referencia*, constituida por todos los pacientes diagnosticados de infección por VIH antes del 1 de Enero de 1999 residentes en la provincia de Granada.

2. *Población potencialmente accesible*, está constituida por los pacientes diagnosticados de infección por VIH que cumplen las siguientes condiciones:
 - Haber sido admitidos en la Unidad de Infecciosos del Servicio de Patología General del Hospital San Cecilio de Granada durante el periodo de inclusión.
 - Permanecer bajo control y seguimiento clínico en la citada Unidad, durante al menos 3 años a lo largo del periodo de seguimiento.
 - Disponer en la Seroteca de la Unidad, de al menos una muestra de suero por cada paciente y año de evolución.
 - Tener historia clínica identificada y accesible.

Esta segunda población de estudio fue dividida en dos grupos:

Pacientes viroinmunológicamente estables (EVI): Este primer grupo se caracteriza porque durante el periodo de seguimiento, tiene determinada una carga viral indetectable (< 50 copias/mL). Se ha dividido en 3 subgrupos en función del recuento de linfocitos CD4⁺ existente en la primera determinación que se realiza durante el periodo de inclusión:

- + *Nivel de inmunidad bajo* (EVI CD4⁺ < 200), formado por pacientes con menos de 200 linfocitos CD4⁺/μL.

+ *Nivel de inmunidad medio* (EVI CD4⁺ 200-500) , pacientes con un nivel de linfocitos CD4⁺ entre 200 y 500 linfocitos CD4⁺/μL.

+ *Nivel de inmunidad alto* (EVI CD4⁺ > 500), pacientes con más de 500 linfocitos CD4⁺/μL.

Pacientes con fracaso virológico documentado (FV): son pacientes admitidos en la Unidad de Infecciosos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada en cualquier momento del estudio, en los que se haya determinado el paso de una carga indetectable a una carga viral detectable > 5000 copias/mL.

Además del fracaso y cumplir las condiciones anteriormente citadas, estos pacientes deben disponer, en la Seroteca de la Unidad, de al menos cuatro muestras de suero (dos previas al instante del fracaso, otra durante el mismo y una tercera finalizada éste).

Selección de los pacientes

Para identificar los pacientes objeto de estudio se utilizó un listado procedente del Servicio de Microbiología en el que se proporcionaba información sobre el código del paciente, la fecha de obtención de la muestra, y la carga viral en dicho momento. Se seleccionaron un total de 84 pacientes con al menos un fracaso viral y 95 viroinmunológicamente estables, sin que a priori se conociese el subgrupo de pacientes en el que se incluían en función del recuento de CD4⁺.

Se incluyeron 20 controles sanos (8 varones y 12 mujeres). Puesto que el objeto de su inclusión era obtener un punto de referencia sobre los valores de Hsp70

en sujetos sanos se obtuvieron muestras de sangre suministradas por el Equipo de Extracciones del Banco de Sangre de Granada.

Fuentes de información

Toda la información recogida se obtuvo de las Historias Clínicas de la Unidad de Infecciosos del Hospital Universitario San Cecilio. Un profesional sanitario de la Unidad de Infecciosos nos proporcionó la información solicitada a partir de una base de datos de Historias Clínicas informatizadas. La información accesible fue por tanto sólo la información previamente codificada.

Para la recogida de información se utilizó un protocolo previamente diseñado (Anexo I).

Variables de estudio

1. Identificación: A cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, se le adjudicó un número y un código formado por letras (las dos primeras letras del nombre, primer y segundo apellido).
2. Características demográficas:
 - Edad, se recogió la fecha de nacimiento. Posteriormente esta variable se convirtió en edad en el momento de selección de la primera muestra.
 - Sexo.

ANEXO I	
Protocolo de recogida de datos clínicos	
<p>Código de identificación: _____ Edad/Fecha de Nacimiento: _____ Sexo: 1. Varón; 2. Mujer Fecha VIH conocido: __/__/__ Estadío en el momento de inclusión (1ª consulta): ____ Grupo de riesgo: 1. Sexual; 2. UDVP; 3. Otros Grupo de paciente: 5. Fracaso virológico 6. EVI CD4⁺ <200 7. EVI CD4⁺ 200-500 8. EVI CD4⁺ >500</p>	
<p>MOMENTO DE MUESTREO 1 Fecha: __/__/__ Carga viral: _____ Progresión clínica: 1. Si; 2. No. Especificar si 1: _____ Analítica: Creatinina: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Tratamiento: 1. Si; 2. No. Inhibidores de la proteasa: 1. Si; 2. No. Análogos de nucleósidos/nucleótidos: 1. Si; 2. No. No análogos de nucleósidos: 1. Si; 2. No. Otros: 1. Si; 2. No.</p>	<p>MOMENTO DE MUESTREO 2 Fecha: __/__/__ Carga viral: _____ Progresión clínica: 1. Si; 2. No. Especificar si 1: _____ Analítica: Creatinina: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Tratamiento: 1. Si; 2. No. Inhibidores de la proteasa: 1. Si; 2. No. Análogos de nucleósidos/nucleótidos: 1. Si; 2. No. No análogos de nucleósidos: 1. Si; 2. No. Otros: 1. Si; 2. No.</p>
<p>MOMENTO DE MUESTREO 3 Fecha: __/__/__ Carga viral: _____ Progresión clínica: 1. Si; 2. No. Especificar si 1: _____ Analítica: Creatinina: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Tratamiento: 1. Si; 2. No. Inhibidores de la proteasa: 1. Si; 2. No. Análogos de nucleósidos/nucleótidos: 1. Si; 2. No. No análogos de nucleósidos: 1. Si; 2. No. Otros: 1. Si; 2. No.</p>	<p>MOMENTO DE MUESTREO 4 Fecha: __/__/__ Carga viral: _____ Progresión clínica: 1. Si; 2. No. Especificar si 1: _____ Analítica: Creatinina: _____ GPT: _____ CPK: _____ CHL-t: _____ CD4⁺: _____ CD8⁺: _____ Tratamiento: 1. Si; 2. No. Inhibidores de la proteasa: 1. Si; 2. No. Análogos de nucleósidos/nucleótidos: 1. Si; 2. No. No análogos de nucleósidos: 1. Si; 2. No. Otros: 1. Si; 2. No.</p>

3. Variables relacionadas con la infección por VIH.

- Fecha en la que se diagnóstica por primera vez la infección.
- Mecanismo de transmisión [sexual, usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP), otros].
- Situación clínica en el momento de inclusión del paciente en el estudio. Se clasificó de acuerdo con el estadio clínico e inmunológico en 9 categorías (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 o C3).

CATEGORÍAS INMUNOLÓGICAS	CATEGORÍAS CLÍNICAS		
	A: leves	B: moderados	C: severos
1 Normal	A1	B1	C1
2 Moderada	A2	B2	C2
3 Grave	A3	B3	C3

- Grupo de paciente: El primer grupo (Fracaso Viroológico, FV) estuvo compuesto por los pacientes que en algún momento de la evolución presentaban una carga viral superior a 5000 copias/mL, independientemente de la situación inmunológica. Los pacientes viroinmunológicamente estables (EVI) se clasificaron en función del recuento de CD4⁺:
 - EVI CD4⁺ < 200
 - EVI CD4⁺ 200-500
 - EVI CD4⁺ > 500

4. Información referida a cada punto de muestreo:

- Fecha de la obtención de la muestra.
- Carga viral.
- Progresión clínica: se consideró que existía cuando en la revisión clínica correspondiente al punto de muestreo se

indicaba la existencia de alguna enfermedad intercurrente asociada o no a la infección por VIH. En caso afirmativo se especificó dicha patología mediante una variable cualitativa.

- Analítica: se recogieron los valores determinados para creatinina, enzimas hepáticas [(glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y creatinfosfoquinasa (CPK)], colesterol total (CHL-T), CD4⁺ y CD8⁺
- Tratamiento: en cada caso se recogió la indicación de fármacos pertenecientes a los siguientes grupos: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa y otros. Sin embargo, no se obtuvo información sobre el número de fármacos de cada grupo prescrito o el fármaco concreto que se utilizaba.

Recogida y tratamiento de muestras

Los sueros utilizados en el estudio fueron proporcionados por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio. Se trataba de muestras de suero obtenidas por centrifugación y conservadas congeladas a - 80 °C en fracciones alícuotas de 250 µL. Las muestras objeto de estudio fueron identificadas a partir de códigos y fechas de los sueros existentes en el listado que nos permitió identificar a los pacientes del estudio.

Las muestras de los controles sanos se centrifugaron durante 10-15 minutos a 3000 rpm, y el suero se repartió en partes alícuotas de 250 µL que se congelaron a - 80° C.

Cuantificación de Hsp70

El método utilizado ha sido ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay), que utiliza anticuerpos unidos covalentemente a una fosfatasa alcalina. Para la detección de Hsp (antígeno) a partir de las muestras de suero, el ELISA utilizado es el denominado directo.

En esta técnica, el antígeno es “atrapado” entre dos capas de anticuerpos, por lo que este método también se denomina ELISA en sándwich (Figura 12). La muestra se añade a los pocillos de una placa de microtitulación previamente recubiertos con anticuerpos específicos para Hsp70. Si esta proteína está presente en la muestra queda fijada en los sitios de unión de los anticuerpos. Después de eliminar mediante lavado



el material no unido se añade un segundo anticuerpo con la enzima conjugada. Este anticuerpo también es específico para Hsp70, de tal forma que se une a cualquiera de los determinantes antigénicos restantes expuestos. Después del lavado, la actividad de la enzima del material unido en cada pocillo se determina añadiendo el sustrato de la enzima. El color que se forma es proporcional a la cantidad de Hsp presente.

Para la determinación de las Hsp, se ha realizado la técnica ELISA siguiendo la metodología utilizada por POCKLEY y cols. (1998), realizándose al menos 2 determinaciones en cada muestra de suero.

Material

Placas microtiter de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp)

Murine monoclonal antibody específico para Hsp70 humanas inducibles (clone C92F3A-5; StressGen cat # SPA-810)

Cápsulas para buffer carbonato-bicarbonato (Sigma cat # C-3041)

Tampón fosfato (phosphate buffered saline, PBS)

Tween20 (Merk art. 822184)

Albúmina de suero bovino (BSA, Sigma cat # 2153)

Proteína Hsp70 recombinante humana (StressGen cat # NSP-555B)

Anticuerpo policlonal anti-Hsp70 de conejo (Stressgen cat # SPA-812E)

Suero de ratón (Sigma cat # M5905)

Inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (Sigma cat # A-2556)

Substrato cromógeno de para-nitrofenil (*p*-NPP, Sigma cat # N-2770).

Reactivos

PBS × 10

NaCl	80.0	g
Na ₂ HPO ₄	11.6	g
KH ₂ PO ₄	2.0	g
KCl	2.0	g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl ó NaOH, y completar hasta 1 L con agua destilada. Se puede esterilizar en autoclave.

Buffer de bloqueo (PBS con 1% de BSA)

PBS × 10	2.5	mL
Albúmina de suero bovino (BSA)	0.25	g
Agua destilada, c.s.p.	25	mL

PBS-T (buffer de lavado con 0.05% de Tween 20)

PBS × 10	100	mL
Tween 20	0.5	mL (0.555 g)
Agua destilada, c.s.p.	1000	mL

Procedimiento

1. Fijar en una placa de microtiter de 96 pocillos los anticuerpos monoclonales específicos anti-Hsp70 humana inducible. Para ello se añaden 100 µL de una solución de 6 µg/mL en buffer carbonato (pH 9.5), y se deja durante una noche a 4 °C.

(Mouse Anti-Hsp70 Monoclonal Antibody; StressGen, SPA-810; 200 µg, 1.0 mg/mL).

Para los 96 pocillos se necesitan $96 \times 100 \mu\text{l} = 9.6 \text{ mL}$ (aproximadamente 10 mL).
La cantidad de anticuerpo que necesitamos es:

$$\begin{array}{r} 6 \mu\text{g} \text{ ----- } 1 \text{ mL} \\ x \text{ ----- } 10 \text{ mL} \end{array} \quad x = 60 \mu\text{g}$$

Como la concentración del anticuerpo es de 1 mg/mL:

$$\begin{array}{r} 1000 \mu\text{g} \text{ ----- } 1000 \mu\text{l} \\ 60 \mu\text{g} \text{ ----- } x \end{array} \quad x = 60 \mu\text{l}$$

Preparación extemporánea: añadir 60 μl del anticuerpo a 10 mL de buffer carbonato.

2. Eliminar la solución de anticuerpo sacudiendo la placa y golpeando sobre un papel de filtro con los pocillos hacia abajo. Añadir en cada pocillo 200 μl de *buffer de bloqueo*, e incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Para los 96 pocillos se necesitan $96 \times 200 \mu\text{l} = 19.2 \text{ mL}$, por lo que se preparan 25 mL en un matraz aforado de este volumen.

3. Lavar 3 veces con PBS-T, y a continuación se añaden 100 μl de cada concentración de la curva patrón de proteína Hsp70 recombinante humana o de las muestras (pueden ser diluidas 1/2, 1/5, u otra dilución adecuada). Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

(Recombinant Human Hsp70 Protein; StressGen, NSP-555; 20 μg , 1.3 mg/mL).

La curva patrón se prepara a partir de Hsp70 recombinante. El vial contiene 20 μg y le añadimos 200 μl de PBS-T, por tanto la concentración es de $20 \mu\text{g}/0.2 \text{ mL} = 100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Se hacen alícuotas de 25 μl en tubos eppendorf y se congelan ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$). Tomar uno de estos viales y añadirle 225 μl de PBS-T, por tanto la concentración es de $(25 \mu\text{l}/250 \mu\text{l}) \times 100 \mu\text{g}/\text{mL} = 10 \mu\text{g}/\text{mL}$. Hacer alícuotas de 25 μl en tubos eppendorf.

Curva patrón desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tomar una alícuota de 25 μl (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y añadirle 225 μl de PBS-T, siendo la concentración resultante de $(25 \mu\text{l}/250 \text{ mL}) \times 10 \mu\text{g}/\text{mL} = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Preparar 6 tubos con 125 μl de PBS-T y hacer diluciones seriadas 1/2 con 125 μl del tubo anterior. Las concentraciones obtenidas son: 1) 1000 ng/mL; 2) 500 ng/mL; 3) 250 ng/mL; 4) 125 ng/mL; 5) 62.5 ng/mL; 6) 31.25 ng/mL; 7) 15.625 ng/mL.

4. Lavar 3 veces con PBS-T, y añadir 100 μl de anticuerpos policlonales anti-Hsp70 (1/400 con PBS-T al 4 % de suero de ratón). Incubar una hora a temperatura ambiente.

Rabbit Anti-Hsp70 (Hsp72) Polyclonal Antibody (StressGen, SPA-812; 100 μl).
Para preparar el anticuerpo policlonal se toman 14.4 mL de PBS-T y se añaden 0.6 mL de suero de ratón. Tomar 12 mL de esta solución y añadir 30 μl de rabbit polyclonal anti-Hsp70 antibody.

5. Lavar 3 veces con PBS-T, y añadir 100 μ l de anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated en PBS-T (1/10000). Incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Monoclonal Anti-Rabbit IgG (γ -Chain Specific) Clone Rg-96 Alkaline Phosphatase Conjugated (Sigma cat # A-2556).

Para preparar el conjugado, tomar 15 mL de PBS-T y añadirle 1.5 μ l de Monoclonal Anti-Rabbit IgG.

6. Lavar 3 veces con PBS-T, y añadir 200 μ l de p-nitrofenil-fosfato. Colocar en la oscuridad hasta el desarrollo del color.

Sigma FAST p-Nitrophenyl Phosphatase Tablets (pNPP): Este reactivo se suministra en forma de 2 tabletas. Se prepara añadiendo la tableta de buffer en 20 mL de agua destilada, y una vez disuelta, se añade la tableta de p-nitrofenil fosfato. Se puede conservar a - 20 °C.

7. Transcurrido un intervalo de tiempo de 10-30 minutos (hasta que el desarrollo del color sea el adecuado), se miden las absorbancias a 405 y 630 nm.
8. El cálculo de las concentraciones a través de la absorbancia se realizará mediante la obtención de la recta de regresión con las variables absorbancia y concentración de la curva patrón.

Análisis estadístico

Con objeto de cubrir los objetivos del trabajo se llevó a cabo un análisis estadístico que se puede dividir en dos partes:

1. Para cada una de las variables objeto del estudio se llevó a cabo un estudio descriptivo con las medidas típicas de resumen (media, desviación típica, rango, etc.).
2. Para llevar a cabo la comparación entre grupos de pacientes se empleó una metodología no clásica debido al tipo de muestreo empleado; en efecto, para los pacientes que habían fracasado se disponían de cuatro medidas, dos antes del fracaso, una en el fracaso y otra tras el fracaso, para los pacientes que no habían fracasado se disponía de dos medidas y para los controles de una única medida; como las medidas así obtenidas no eran independientes no se pudo aplicar la metodología común para observaciones independientes por lo que hubo que emplear la metodología de modelos GEE (HARDIN y HILBE, 2003), en la que se empleó como estructura de la matriz de covarianzas la estructura intercambiable (exchangeable); estos modelos hacen uso de las relaciones entre las observaciones y permitieron modelar correctamente los datos de que disponíamos. Estos modelos GEE (formalmente parecidos a los modelos de regresión lineal múltiple) nos permitieron detectar si la asociación entre cada variable y los niveles de la proteína era significativa o no.

En todos los casos en que fue necesario se corrigió la medida de la proteína para conseguir que las varianzas fueran homogéneas, empleándose el logaritmo neperiano de la medida más uno como la transformación más común, puesto que con ella se conseguía estabilizar las varianzas.

Dado el número tan grande de comparaciones llevadas a cabo se empleó el nivel del 0.05 para declarar en un primer nivel, el resultado como significativo. El programa empleado en todos los análisis fue STATA 8.1 dentro del comando *xtgee*.

Resultados

Los resultados incluyen las características de los sujetos incluidos en este estudio y las propiedades de los sueros obtenidos en diferentes momentos de la progresión de la infección por VIH y/o SIDA (según los criterios establecidos previamente), de interés por su posible relación con las proteínas de estrés.

Características de los pacientes

De acuerdo con los criterios de inclusión y las limitaciones operativas, se han incluido en este estudio 61 pacientes, de los cuales 25 han sufrido un fracaso virológico durante el periodo de estudio.

En la Tabla 15 se recogen las características de los pacientes estudiados. La mayor parte de ellos fueron varones (Figura 13), con una edad media de 38.3 años, que osciló entre 22 y 70 años (Figura 14). El mecanismo de transmisión fue por vía parenteral (usuarios de drogas por vía parenteral) en 35 casos y por vía sexual en 23. El resto se agrupan en otras categorías (Figura 15).

El diagnóstico de VIH se realizó entre el año 1983 y el 2001, por lo que el tiempo de evolución de la infección por VIH en los pacientes estudiados hasta el momento de su inclusión en el estudio oscila entre 1 y 17 años, con una media de 8.14 años y una desviación estándar de 4.95 años (Figura 16).

En relación con el estadio, 23 pacientes se incluían en un estadio A, en su mayor parte A2 o A3, 17 en estadio B y 21 en estadio C, todos ellos C3 (Figura 17).

TABLA 15. Estudio descriptivo de los pacientes en el momento de su inclusión en el estudio. Tabla de frecuencias.

VARIABLE	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Sexo</i>		
<i>Varón</i>	46	75.41
<i>Mujer</i>	15	24.59
<i>Edad</i>		
≤ 30	6	9.84
31-35	15	24.59
36-40	16	26.23
41-45	18	29.51
> 45	6	9.84
<i>Mecanismo de transmisión</i>		
<i>Sexual</i>	23	37.70
<i>UDVP</i>	35	57.38
<i>Otros</i>	3	4.92
<i>Tiempo de evolución (años)</i>		
≤ 4	15	24.59
4,1-8	15	24.59
8,1-12	13	21.31
> 12	18	29.51
<i>Estadio en el momento de inclusión en el estudio</i>		
A1	1	1.64
A2	12	19.67
A3	10	16.39
B1	1	1.64
B2	5	8.20
B3	11	18.03
C3	21	34.43
<i>Situación viroinmunológica</i>		
<i>Fracaso virológico</i>	25	40.98
EVI < 200 CD4 ⁺ /μL	4	6.56
EVI 200-500 CD4 ⁺ /μL	11	18.03
EVI > 500 CD4 ⁺ /μL	21	34.43

UDVP: Usuarios de drogas por vía parenteral.

EVI: Estabilidad viroinmunológica.

FIGURA 13. Distribución de los pacientes por sexo

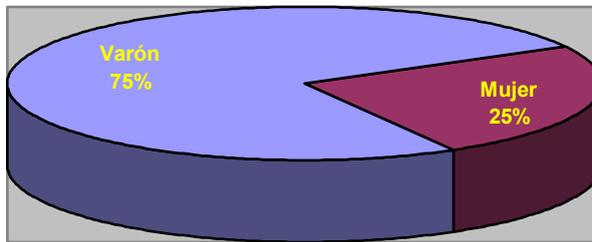


FIGURA 14. Distribución porcentual de los pacientes por intervalos de edad

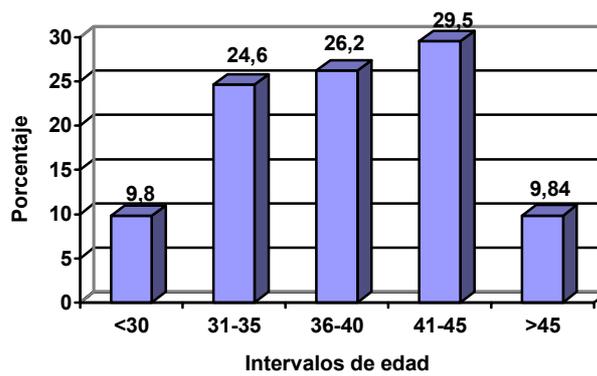


FIGURA 15. Distribución de los pacientes según el mecanismo de transmisión del VIH

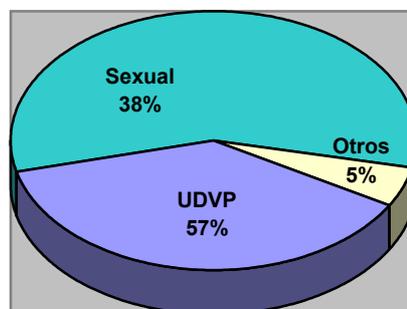


FIGURA 16. Distribución porcentual de los enfermos según el tiempo de evolución (años) desde el momento de la infección

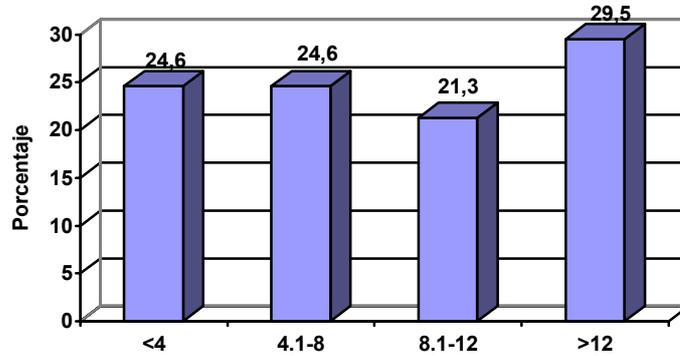
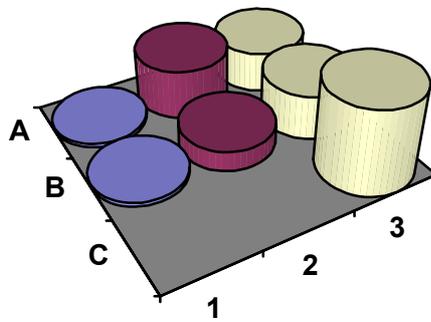


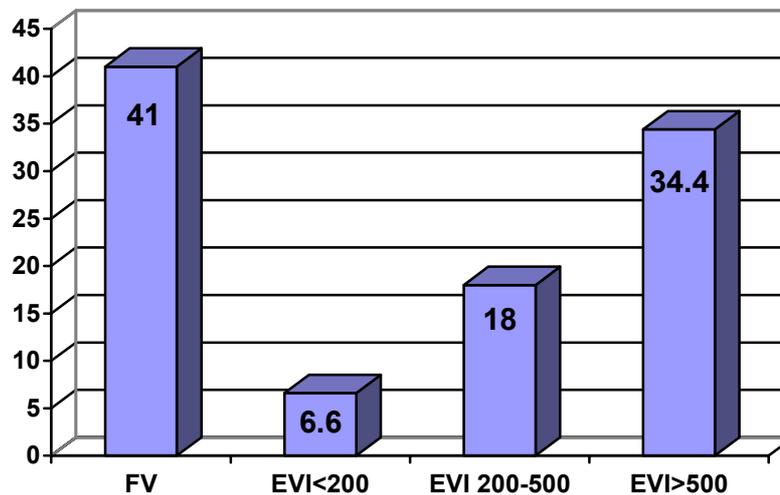
FIGURA 17. Distribución porcentual en función del estadio en el momento de inclusión en el estudio



En la Figura 18 y Tabla 16 se recogen las características de los pacientes estratificadas por su categoría viroinmunológica. Puede comprobarse como las mujeres estudiadas están proporcionalmente más representadas entre los pacientes con mejor estado inmunológico, sin embargo, no se observan diferencias en la distribución por edad de los distintos grupos de pacientes estudiados.

Para el mecanismo de transmisión se observa un fenómeno similar al descrito para el sexo, en el sentido de que los pacientes infectados por utilización de drogas vía parenteral están proporcionalmente más representados entre los pacientes con fracaso virológico o recuento de $CD4^+ < 200 \mu L$. Las diferencias llegan a ser significativas cuando se comparan los pacientes con fracaso virológico frente al resto y se excluyen aquellos con “otros” mecanismos de transmisión ($\chi^2_{(1g.l.)} = 4.2444, p < 0.05$).

FIGURA 18. Distribución porcentual de los pacientes según su situación viroinmunológica en el momento de su inclusión en el estudio



El tiempo de evolución de la infección por VIH se comportó de forma homogénea a través de los diferentes estratos viroinmunológicos, con tiempos medios que oscilaron entre 7.3 y 9 años de evolución.

Tabla 16. Distribución de las características de los pacientes estudiados en relación con su categoría viroinmunológica.

	FV N (%)	CD4⁺ < 200 N (%)	CD4⁺ 200-500 N (%)	CD4⁺ > 500 N (%)
SEXO				
<i>Varón</i>	23 (92.00)	4 (100)	5 (45.45)	14 (66.67)
<i>Mujer</i>	2 (8.00)	-	6 (54.55)	7 (33.33)
EDAD				
≤ 30 años	3 (12.00)	-	3 (27.28)	-
31-35 años	8 (32.00)	2 (50.00)	1 (9.09)	4 (19.05)
36-40 años	5 (20.00)	1 (25.00)	4 (36.36)	6 (28.57)
41-45 años	6 (24.00)	1 (25.00)	2 (18.18)	9 (42.86)
> 45 años	3 (12.00)	-	1 (9.09)	2 (9.52)
MECANISMO DE TRANSMISIÓN				
<i>Sexual</i>	6 (24.00)	1 (25.00)	6 (54.55)	10 (47.62)
<i>UDVP</i>	17 (68.00)	3 (75.00)	4 (36.36)	11 (52.38)
<i>Otros</i>	2 (8.00)	-	1 (9.09)	-
TIEMPO DE EVOLUCIÓN				
≤ 4 años	6 (24.00)	2 (50.00)	4 (36.36)	3 (14.29)
4,1 – 8 años	7 (28.00)	-	2 (18.18)	6 (28.57)
8,1 – 12 años	6 (24.00)	-	2 (18.18)	5 (23.81)
> 12 años	6 (24.00)	2 (50.00)	3 (27.28)	7 (33.33)

Sólo dos de los pacientes estudiados se encontraban sin tratamiento en el momento de la recogida de información. El análisis descriptivo de esta variable es complejo por su evolución a lo largo del tiempo, por lo que se indican las asociaciones terapéuticas recogidas en cada uno de los puntos de muestreo. No obstante, en todos los casos la asociación encontrada con mayor frecuencia fue un inhibidor de la proteasa junto a uno o más inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleosidos (Tabla 17).

Tabla 17. Distribución de pacientes según el momento de muestreo y tipo de tratamiento.

TIPO DE TRATAMIENTO	1 N (%)	2 N (%)	3 N (%)	4 N (%)
<i>Análogos de nucleósidos</i>	8 (13.56)	10 (16.95)	11 (18.96)	1 (4.17)
<i>Análogos de nucleósidos + inhibidores de la proteasa</i>	29(49.15)	28 (47.46)	24 (41.38)	16 (66.67)
<i>Análogos de nucleósidos + Inhibidores de la proteasa + No análogos de nucleósidos</i>	4 (6.78)	4 (6.78)	4 (6.90)	2 (8.33)
<i>Análogos de nucleósidos + No análogos de nucleósidos</i>	18(30.51)	17 (28.81)	19 (32.76)	5 (20.83)

Las Tablas 18 a 24 muestran los valores medios, desviaciones estándar, mínimos y máximos para cada una de las variables analíticas incluidas en el estudio, estratificadas en función de la situación viroinmunológica y punto de muestreo (el punto 3 corresponde al fracaso virológico, los puntos 1 y 2 son anteriores a este, el 1 más lejano del 3 y el 2 más próximo) y el punto 4 es posterior. En los pacientes con estabilidad viroinmunológica, sólo se dispone de 3 puntos de muestreo. Las figuras 19 a 22 representan estos valores gráficamente de las variables analíticas GPT, CPK, CD4⁺ y CD8⁺.

La observación de los datos incluidos en estas tablas sugiere que los pacientes muestran una importante estabilidad en los parámetros recogidos a lo largo del período de estudio. Destaca el aumento de la carga viral en el punto 3 en los pacientes con fracaso virológico, definidos precisamente por esta característica (Tabla 18), y puede apreciarse un discreto aumento de los valores de GPT en este mismo grupo de pacientes coincidiendo con el punto 3 (Tabla 20; Figura 19). En relación con el resto de parámetros mencionar una tendencia creciente en el recuento de linfocitos CD8⁺ que se observa en todos los grupos de pacientes (Tabla 24; Figura 22).

Tabla 18. Valores medios de carga viral (copias/mL) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	33.48 \pm 42.99 (0 - 200)	16.4 \pm 18.57 (0 - 50)	72058 \pm 147370.1 (6100 - 680000)	33.33 \pm 23.67 (0 - 70)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	43.75 \pm 12.5 (25 - 50)	50 \pm 0 (50 - 50)	50 \pm 0 (50 - 50)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	30.91 \pm 18.95 (0 - 50)	40.91 \pm 16.85 (0 - 50)	43.18 \pm 16.17 (0 - 50)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	44.05 \pm 13.47 (0 - 50)	45.24 \pm 15.04 (0 - 50)	47.62 \pm 10.91 (0 - 50)	-

Tabla 19. Valores medios de creatinina (mg/dL) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	1.13 \pm 0.26 (0.79 - 1.91)	1.14 \pm 0.25 (0.70 - 1.81)	1.08 \pm 0.18 (0.70 - 1.63)	1.11 \pm 0.24 (0.70 - 1.80)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	1.02 \pm 0.17 (0.80 - 1.2)	0.99 \pm 0.06 (0.91 - 1.06)	1.10 \pm 0.20 (0.96 - 1.4)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	1.02 \pm 0.16 (0.80 - 1.3)	0.98 \pm 0.22 (0.6 - 1.5)	1.03 \pm 0.25 (0.85 - 1.7)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	1.00 \pm 0.15 (0.8 - 1.30)	0.96 \pm 0.16 (0.63 - 1.30)	1.0 \pm 0.18 (0.71 - 1.43)	-

Tabla 20. Valores medios de GPT (mU/mL) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	76.46 \pm 97.66 (10 - 450)	63.92 \pm 87.73 (9 - 351)	91.00 \pm 114.59 (9 - 467)	60.56 \pm 55.99 (13 - 211)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	65 \pm 63.47 (28 - 160)	78 \pm 79.62 (29 - 196)	75.75 \pm 64.32 (23 - 169)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	46.91 \pm 54.94 (7 - 202)	37.36 \pm 34.12 (10 - 128)	34.55 \pm 36.02 (9 - 137)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	45.52 \pm 29.10 (9 - 137)	43.43 \pm 29.53 (17 - 143)	44.43 \pm 26.41 (11 - 111)	-

Tabla 21. Valores medios de CPK (U/mL) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	157.58 \pm 180.85 (38 - 793)	114.28 \pm 80.46 (45 - 436)	109.83 \pm 81.23 (26 - 382)	132.42 \pm 116.40 (10 - 569)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	81.75 \pm 43.11 (39 - 131)	162 \pm 183.18 (31 - 425)	89 \pm 57.81 (32 - 146)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	91.91 \pm 70.05 (32 - 237)	93.91 \pm 56.55 (32 - 220)	73.82 \pm 33.17 (33 - 130)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	149 \pm 199.95 (33 - 986)	137.35 \pm 107.48 (28 - 425)	136.86 \pm 105.16 (35 - 436)	-

Tabla 22. Valores medios de colesterol total (mg/dL) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	194 \pm 43.10 (131 - 266)	212.22 \pm 42.80 (129 - 305)	190.24 \pm 47.90 (113 - 317)	206.21 \pm 51.37 (113 - 302)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	183.75 \pm 38.65 (154 - 236)	192.25 \pm 41.92 (140 - 230)	175.25 \pm 37.35 (131 - 217)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	206 \pm 84.10 (36 - 321)	229.60 \pm 39.08 (152 - 271)	212 \pm 51.38 (132 - 277)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	242.86 \pm 138.23 (122 - 813)	212.19 \pm 40.49 (108 - 270)	215.90 \pm 43.79 (100 - 301)	-

Tabla 23. Valores medios de linfocitos CD4⁺ (células/ μ L) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	346.58 \pm 260.17 (15 - 896)	431.68 \pm 256.74 (13 - 1015)	401.92 \pm 258.91 (76 - 984)	460.04 \pm 285.92 (69 - 1055)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	127.25 \pm 58.88 (55 - 197)	153 \pm 31.32 (127 - 194)	162.25 \pm 59.57 (110 - 248)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	366.82 \pm 95.01 (179 - 463)	354.55 \pm 72.18 (242 - 514)	410.45 \pm 105.50 (167 - 526)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	775.71 \pm 269.31 (429 - 1513)	755.62 \pm 255.13 (393 - 1393)	857 \pm 238.08 (592 - 1341)	-

Tabla 24. Valores medios de linfocitos CD8⁺ (células/ μ L) en cada paciente estratificados por punto de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	899.96 \pm 474.09 (249 - 2237)	926.40 \pm 504.63 (171 - 2074)	1034.28 \pm 525.35 (282 - 2381)	973.87 \pm 536.79 (261 - 2070)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	599.75 \pm 127.88 (435 - 728)	564.75 \pm 88.42 (483 - 688)	748 \pm 333.83 (435 - 1212)	-
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	743.18 \pm 304.44 (384 - 1352)	743.18 \pm 304.44 (384 - 1352)	807.73 \pm 316.35 (471 - 1502)	-
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	995.90 \pm 321.68 (405 - 1539)	1002.81 \pm 330.47 (423 - 1815)	1175 \pm 392.40 (472 - 1857)	-

También podemos destacar que el recuento de linfocitos CD4⁺ es relativamente alto en los pacientes con fracaso virológico (Tabla23, Figura 21), superior a muchos valores que presentan pacientes virológicamente estables.

Figura 19. Valores de GPT para los diferentes puntos de muestreo en pacientes con fracaso virológico y virológicamente estables.

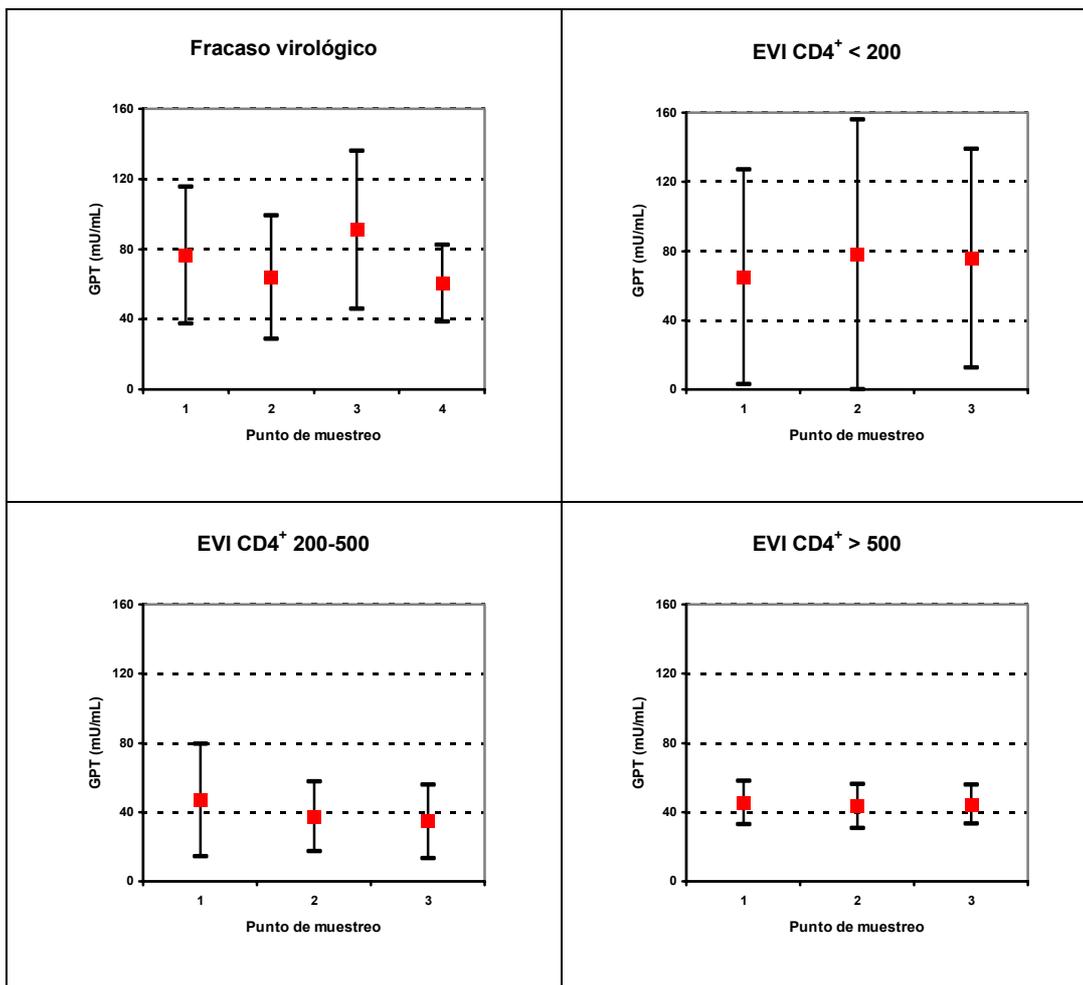


Figura 20. Valores de CPK para los diferentes puntos de muestreo en pacientes con fracaso virológico y virológicamente estables.

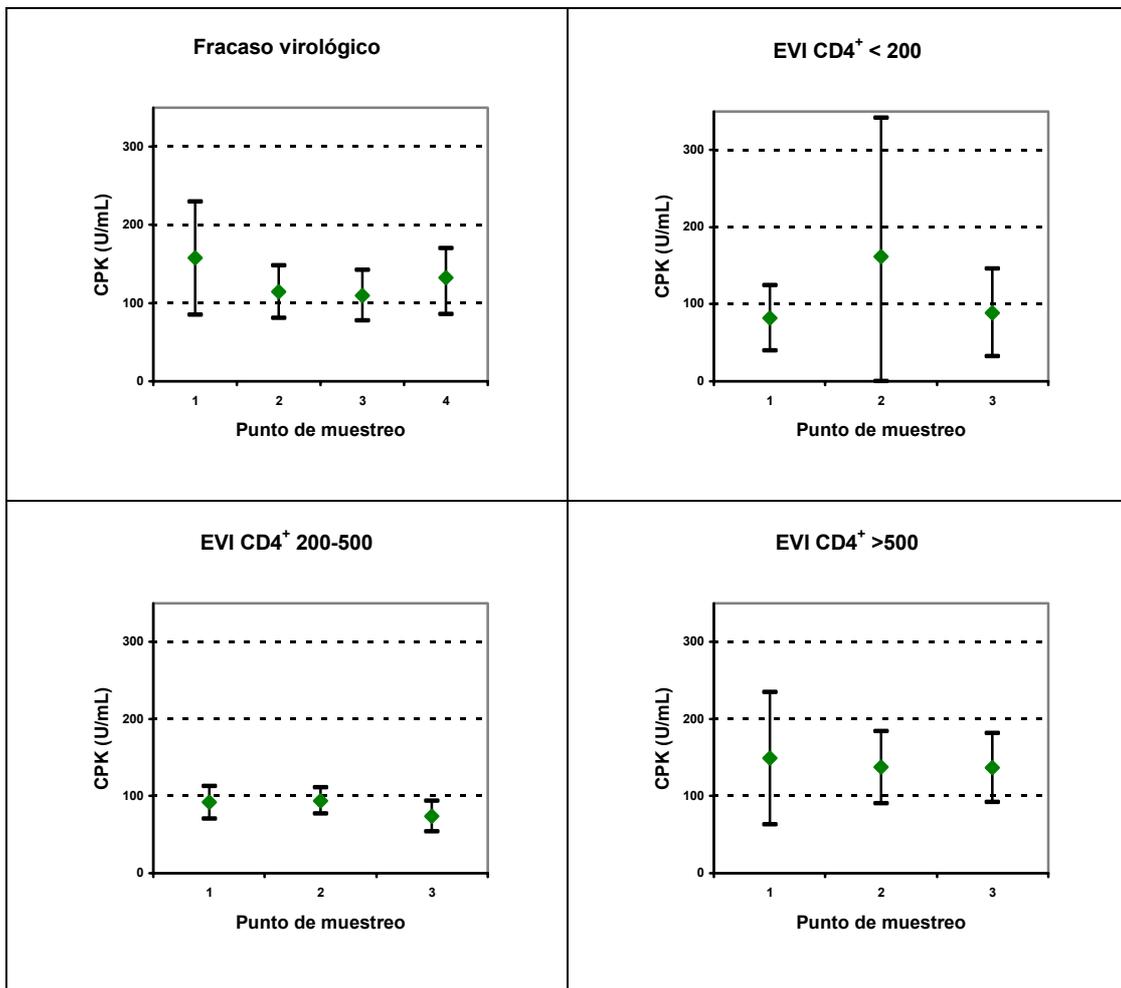


Figura 21. Valores de linfocitos CD4⁺ para los diferentes puntos de muestreo en pacientes con fracaso virológico y virológicamente estables.

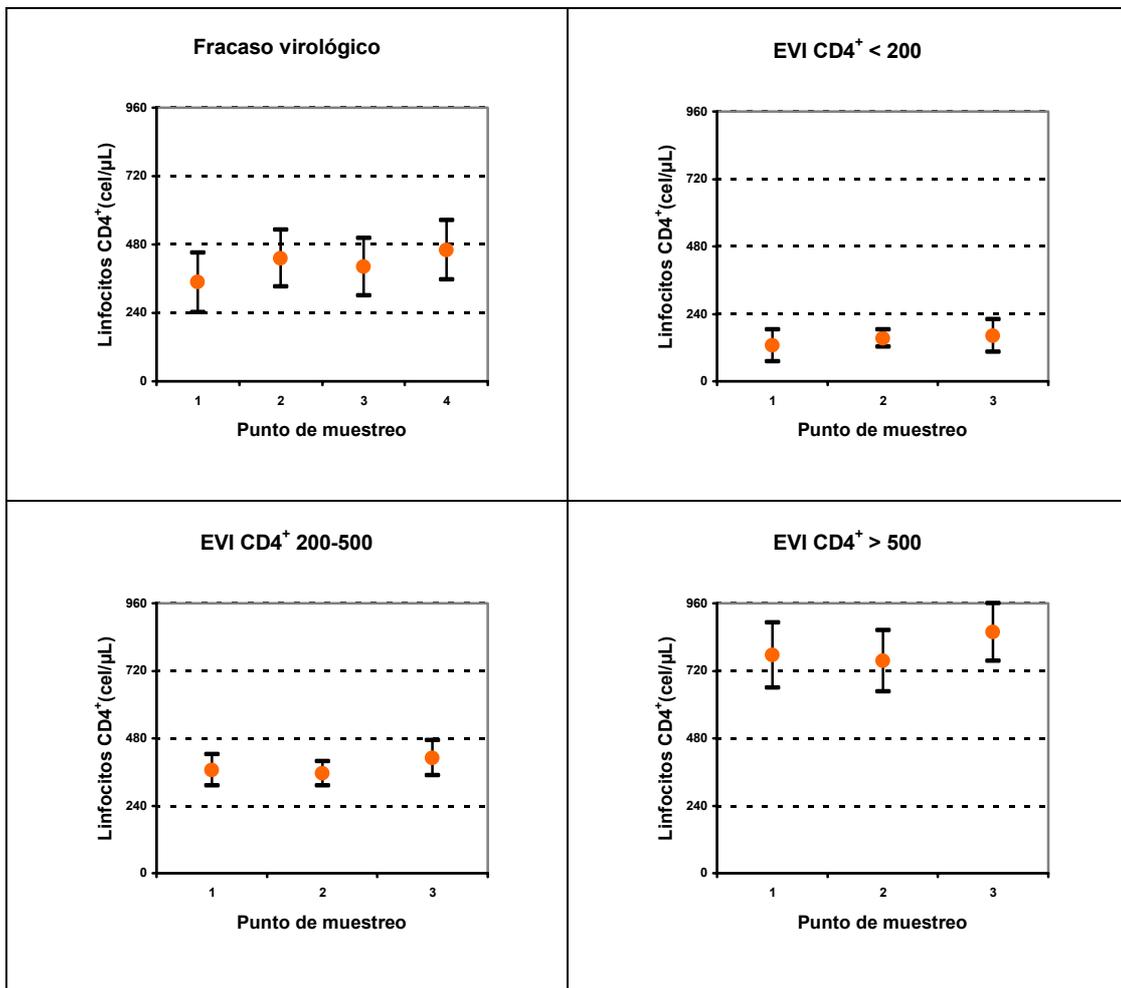
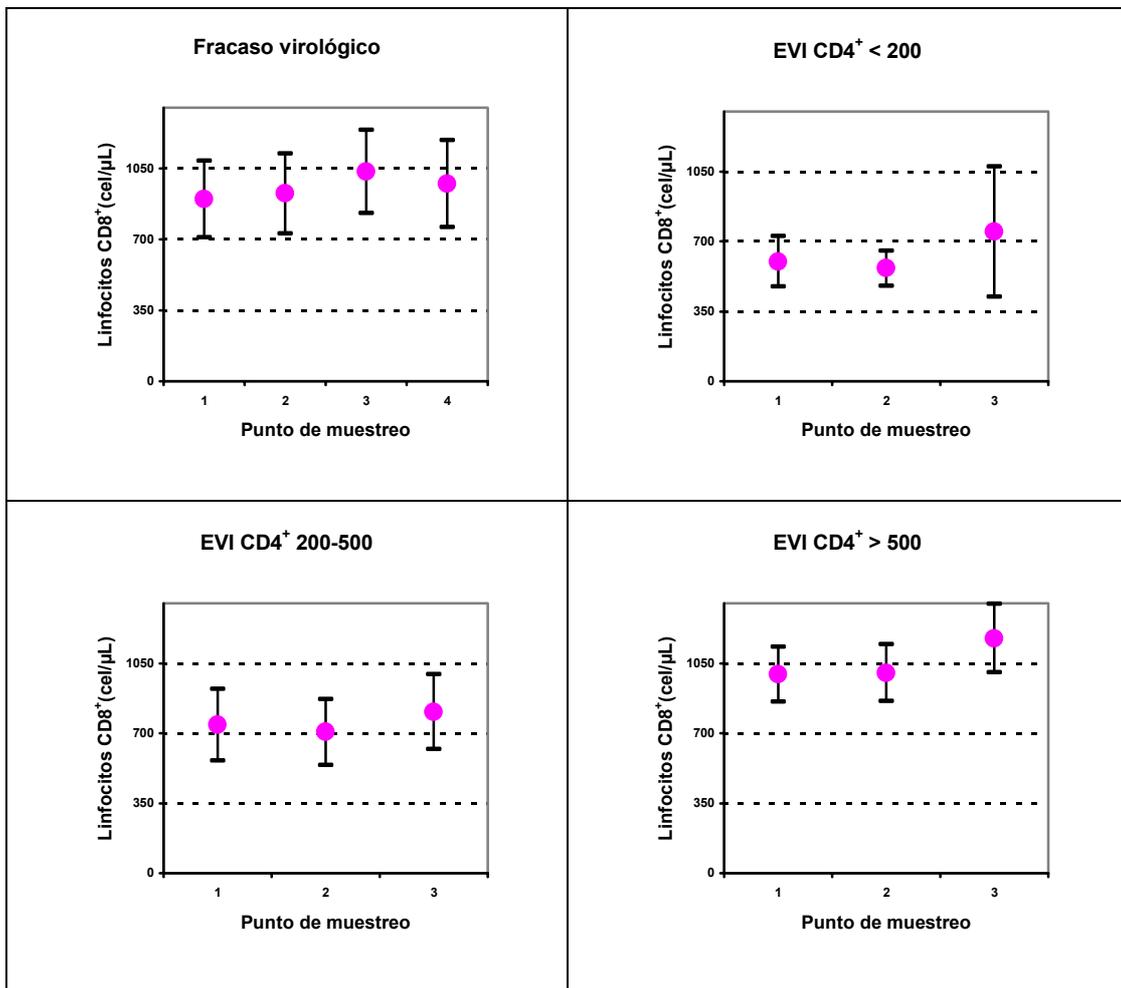


Figura 22. Valores de linfocitos CD8⁺ para los diferentes puntos de muestreo en pacientes con fracaso virológico y virológicamente estables.



Estudio descriptivo de las muestras de suero

Se ha tenido acceso a un total de 174 sueros aunque no en todos los pacientes hemos tenido disponibles sueros de los 4 puntos de muestreo. En 10 de los 25 pacientes con fracaso virológico se pudo determinar Hsp70 en estos cuatro puntos. Para los pacientes virológicamente estables se consiguió acceder a los tres sueros inicialmente previstos en el 86 % de los casos (31 de los 36 pacientes). En tres pacientes no se pudo analizar ninguno de los sueros y en dos faltó solamente uno.

En la Tabla 25 se recoge la distribución del total de sueros obtenidos en relación con el estadio clínico de los pacientes en el momento de su captación en la Unidad de Infecciosos, y respecto al tratamiento antirretroviral. El mayor porcentaje de sueros corresponde a pacientes en estadio C3 (35.1 %), seguido de B3, A2 y A3. En relación al tratamiento, el 87.6 % de los sueros fueron obtenidos en situación de tratamiento antirretroviral del paciente, siendo la asociación más frecuente (97.7 %), la que incluye fármacos del grupo de análogos de nucleósidos.

En la Tabla 26 y Figura 23 se recogen las determinaciones analíticas que corresponden a los sueros analizados, estratificando en fracaso virológico y virológicamente estables. Se han encontrado diferencias casi significativas en los valores de GPT (para varianzas desiguales $t_{\text{exp}} = 1.5175$; $p < 0.1$), y diferencias estadísticamente significativas en los valores de CD4^+ (para varianzas desiguales $t_{\text{exp}} = -2.4576$; $p < 0.01$). Para el resto de las variables no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos.

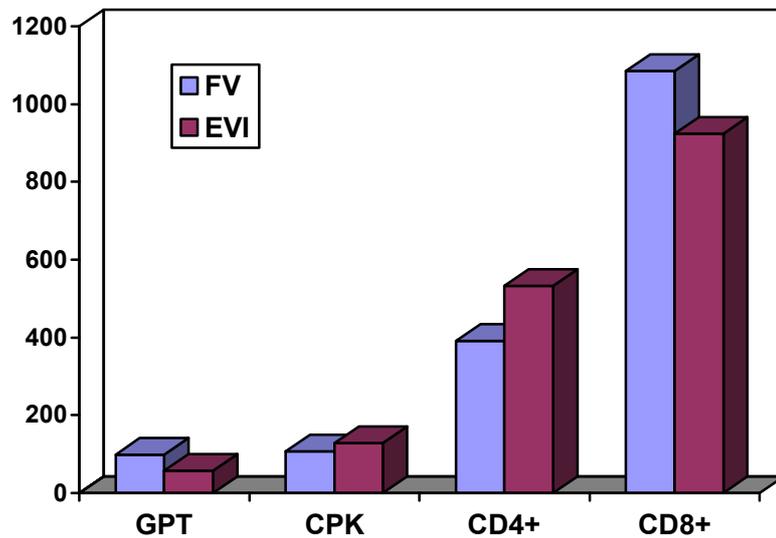
Tabla 25. Estudio descriptivo de los sueros. Tabla de frecuencias.

VARIABLE	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Estadío en el momento de inclusión en el estudio</i>		
<i>A1</i>	3	1.72
<i>A2</i>	31	17.82
<i>A3</i>	27	15.52
<i>B1</i>	2	1.15
<i>B2</i>	16	9.19
<i>B3</i>	34	19.54
<i>C3</i>	61	35.06
<i>Tratamiento antirretroviral</i>		
<i>Si</i>	170	97.70
<i>No</i>	4	2.30
<i>Tipo de tratamiento antirretroviral</i>		
<i>Análogos de nucleósidos</i>	29	16.96
<i>Análogos de nucleósidos + Inhibidores de la proteasa</i>	81	47.37
<i>Análogos de nucleósidos + Inhibidores de la proteasa + No análogos de nucleósidos</i>	11	6.43
<i>Análogos de nucleósidos + No análogos de nucleósidos</i>	50	29.24

TABLA 26. Estudio descriptivo de las variables analíticas de los sueros.

VARIABLE	FV MEDIA \pm D.E. (MIN-MAX)	EVI MEDIA \pm D.E. (MIN-MAX)
<i>Carga viral (copias/mL)</i>	74640.48 \pm 160561.90 (6100 - 680000)	38.10 \pm 20.45 (0 - 90)
<i>Creatinina (mg/dL)</i>	1.09 \pm 0.19 (0.7 - 1.63)	1.05 \pm 0.19 (0.63 - 1.8)
<i>GPT (mU/mL)</i>	98.24 \pm 121.60 (9 - 467)	57.22 \pm 63.25 (9 - 450)
<i>CPK (U/mL)</i>	107.25 \pm 84.45 (26 - 382)	127.80 \pm 123.37 (10 - 986)
<i>CHL-t (mg/dL)</i>	186.05 \pm 48.12 (113 - 317)	212.84 \pm 70.61 (36 - 813)
<i>Linfocitos CD4⁺ (células/μL)</i>	391.67 \pm 232.70 (76 - 941)	532.27 \pm 323.89 (13 - 1513)
<i>Linfocitos CD8⁺ (células/μL)</i>	1085.19 \pm 556.16 (282 - 2381)	924.27 \pm 418.62 (249 - 2237)

Figura 23. Valores medios de las variables estudiadas para las situaciones de fracaso virológico y virológicamente estables.



Determinación de Hsp70

En la Tabla 27 se recogen los valores obtenidos al determinar los niveles séricos de Hsp70: media y desviación estándar. En todos los grupos se observa una variabilidad importante, a pesar de lo cual, puede señalarse la detección de niveles más elevados de Hsp70 en los pacientes con fracaso virológico coincidentes con el momento del fracaso viral. En el resto (pacientes virológicamente estables) los valores de proteína Hsp70 se comportan de manera bastante homogénea (Figura 24).

Tabla 27. Valores medios de Hsp70 (ng/mL) en cada paciente estratificados por puntos de muestreo y estado viroinmunológico.

VARIABLE	PUNTOS DE MUESTREO			
	1	2	3	4
FV MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	93.65 \pm 145.16 (0 - 477.66)	46.17 \pm 92.30 (0 - 349.53)	703.49 \pm 3055.09 (0 - 14032.14)	88.11 \pm 206.45 (0 - 873.31)
CD4 ⁺ < 200 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	47.65 \pm 72.95 (0 - 153.96)	13.24 \pm 26.47 (0 - 52.94)	–	–
CD4 ⁺ 200 - 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	116.02 \pm 165.37 (0 - 430.83)	36.82 \pm 64.40 (0 - 160.04)	70.29 \pm 98.01 (0 - 220.95)	–
CD4 ⁺ > 500 MEDIA \pm D.E. (MIN - MAX)	45.74 \pm 80.10 (0 - 272.39)	77.59 \pm 183.74 (0 - 793.70)	91.23 \pm 203.67 (0 - 905.78)	–

Cuando el estudio se centra en los sueros, comparando el grupo que corresponde al momento del fracaso virológico con el resto de sueros estudiados, se observan valores medios de Hsp70 mucho mayores que en los pacientes viroinmunológicamente estables, sin embargo, dada la magnitud de la desviación estándar, no se consigue detectar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 28, Figura 25).

Figura 24. Valores de Hsp70 (ng/mL) para los diferentes puntos de muestreo en pacientes con fracaso virológico y virológicamente estables.

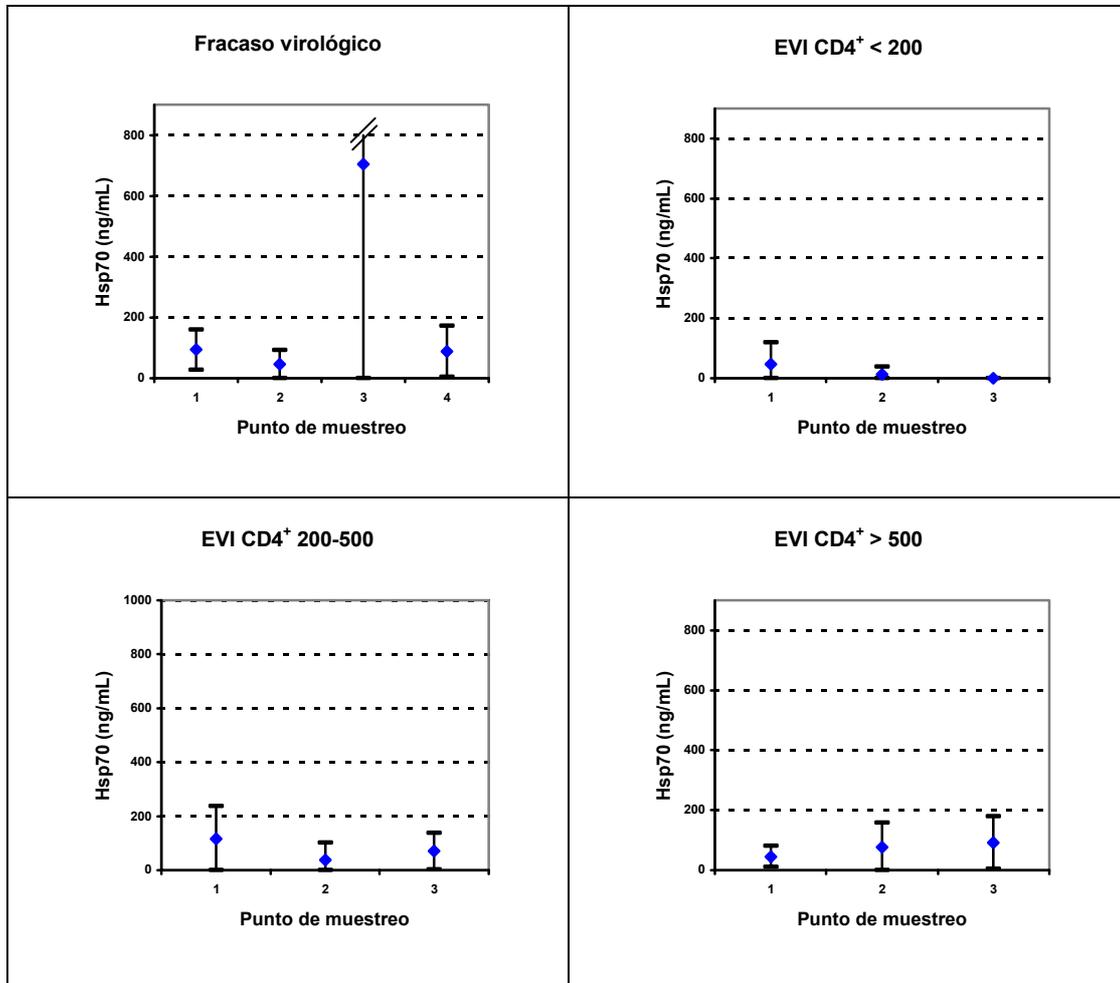
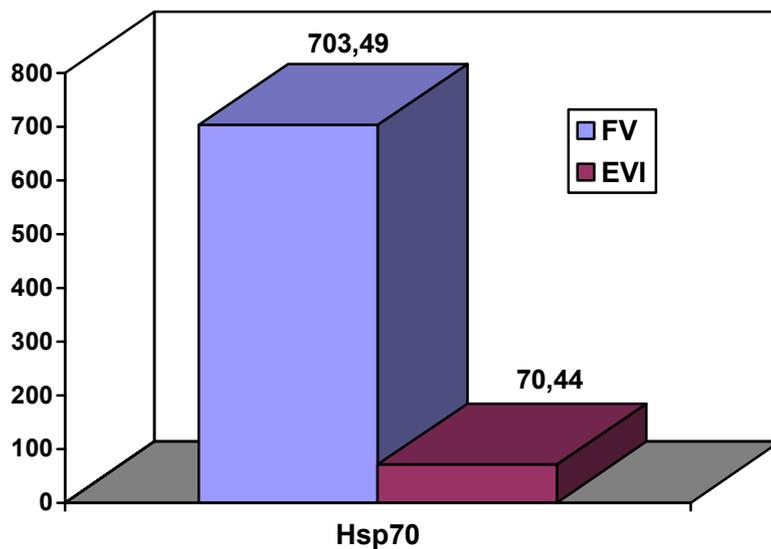


TABLA 28. Valores medios de Hsp70 (ng/mL) en pacientes con fracaso virológico (FV) y virológicamente estables (EVI).

VARIABLE	FV MEDIA ± D.E. (MIN-MAX)	EVI MEDIA ± D.E. (MIN-MAX)
<i>Hsp70 (ng/ml)</i>	703.49 ± 3055.09 (0 - 14032.14)	70.44 ± 144.26 (0 - 905.78)

Figura 25. Valores medios de Hsp70 (ng/mL) en pacientes con fracaso virológico (FV) y virológicamente estables (EVI).



Para analizar la relación entre los valores de Hsp70 y los restantes parámetros clínicos o analíticos disponibles se ha realizado una transformación logarítmica de la variable. En las tablas 29 a 37 se exponen los valores reales de la proteína y su transformación logarítmica, así como los niveles de significación estadística logrados mediante el análisis de dicha transformación logarítmica.

Comparando todos los sueros correspondientes a cada uno de los grupos de pacientes, no se observan diferencias significativas, aún cuando el valor medio continúa siendo superior en los pacientes con fracaso virológico (Tabla 29). Tampoco se observan diferencias significativas cuando se agrupan los sueros correspondientes a pacientes estables, independientemente del estado inmunológico, y los obtenidos de controles sanos (Tabla 30).

TABLA 29. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los pacientes estratificados según su estado inmunológico.

GRUPOS DE PACIENTES	N	VALORES DE HSP70 ABSOLUTOS		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	77	249.07	1597.99	1.97	2.49
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	12	20.29	45.63	1.05	1.93
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	23	72.57	113.59	2.05	2.51
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	62	71.42	163.07	1.98	2.35
<i>Controles</i>	20	72.06	97.21	2.89	2.17

FV: fracaso virológico; EVI: estables viroinmunológicamente; Hsp70: ng/mL
Diferencias no significativas ($p = 0.197$).

TABLA 30. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los sueros de pacientes con fracaso virológico frente a pacientes estables virológicamente y controles.

FRACASO VIROLÓGICO	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Situación de fracaso</i>	77	249.07	1597.99	1.97	2.49
<i>Estables y controles</i>	117	66.51	135.73	2.05	2.34

Diferencias no significativas ($p = 0.885$).

TABLA 31. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los pacientes estratificados según su sexo.

SEXO	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Varón</i>	150	152.47	1149.38	1.70	2.35
<i>Mujer</i>	44	92.96	135.96	3.13	2.23

Diferencias significativas ($p = 0.019$).

Al analizar los resultados en relación al sexo, se encuentran valores medios significativamente más elevados en varones que en mujeres ($p = 0.019$).

Respecto a la situación de fracaso virológico, se observan diferencias significativas en los valores medios de la magnitud considerable. Desde el punto de vista estadístico sin embargo, las diferencias no son significativas dada la heterogeneidad existente en las varianzas. Cuando se comparan las medias de la variable obtenida por transformación logarítmica tampoco se detectan diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 32. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en el momento del fracaso virológico frente a situaciones de no fracaso.

FRACASO VIROLÓGICO	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	21	703.49	3055.09	1.77	2.72
<i>No</i>	173	70.44	144.26	2.05	2.36

Diferencias no significativas ($p = 0.611$).

Cuando se consideran los diferentes estadios de progresión de la enfermedad en el momento de inclusión en el estudio, a pesar de obtener cifras promedio de proteínas Hsp70 elevadas en los pacientes inicialmente más avanzados, los valores logarítmicos de los niveles de esta proteína no muestran diferencias significativas (Tabla 33).

Ni las concentraciones de Hsp70, ni sus valores logarítmicos, muestran una asociación estadísticamente significativa con respecto al tiempo de evolución de la enfermedad, obteniéndose en la correlación lineal unos valores de $p = 0.338$ y un coeficiente de correlación $r = -0.110$, entre el logaritmo neperiano de Hsp70 y el tiempo de evolución. Tampoco se ha encontrado asociación significativa entre

logaritmo neperiano de Hsp70 con $CD4^+$ (Figura 26), con el logaritmo neperiano de la carga viral, con $CD8^+$, y con el cociente $CD4^+/CD8^+$. De los parámetros bioquímicos determinados en los sueros, para la creatinina y el colesterol (Figuras 27 y 28), aunque no se llega a alcanzar significación estadística, los valores muestran indicios. En cambio, sí se alcanza significación estadística para la correlación entre los valores logarítmicos de las concentraciones de Hsp70 y las concentraciones de las enzimas hepáticas GPT y CPK (Tabla 34; Figuras 29 y 30).

TABLA 33. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los diferentes estadios en el momento de inclusión.

ESTADIO EN EL MOMENTO DE INCLUSIÓN	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>A</i>	61	64.39	140.90	1.95	2.31
<i>B</i>	52	88.87	159.90	2.19	2.51
<i>C</i>	61	278.19	1795.09	1.67	2.41

Diferencias no significativas ($p = 0.776$).

Tabla 34. Relación entre logaritmo neperiano de Hsp70 y cada una de las diferentes variables del estudio.

VARIABLE	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
<i>Tiempo de evolución</i>	$p = 0.338$	$r = -0.110$
<i>Ln carga viral</i>	$p = 0.702$	$r = -0.032$
<i>Creatinina</i>	$p = 0.103$	$r = -0.181$
<i>GPT</i>	$p = 0.003$	$r = -0.181$
<i>CPK</i>	$p = 0.0005$	$r = -0.378$
<i>CHL-t</i>	$p = 0.094$	$r = -0.220$
<i>Linfocitos $CD4^+$</i>	$p = 0.431$	$r = 0.104$
<i>Linfocitos $CD8^+$</i>	$p = 0.334$	$r = 0.127$
<i>Cociente $CD4^+/CD8^+$</i>	$p = 0.834$	$r = 0.278$

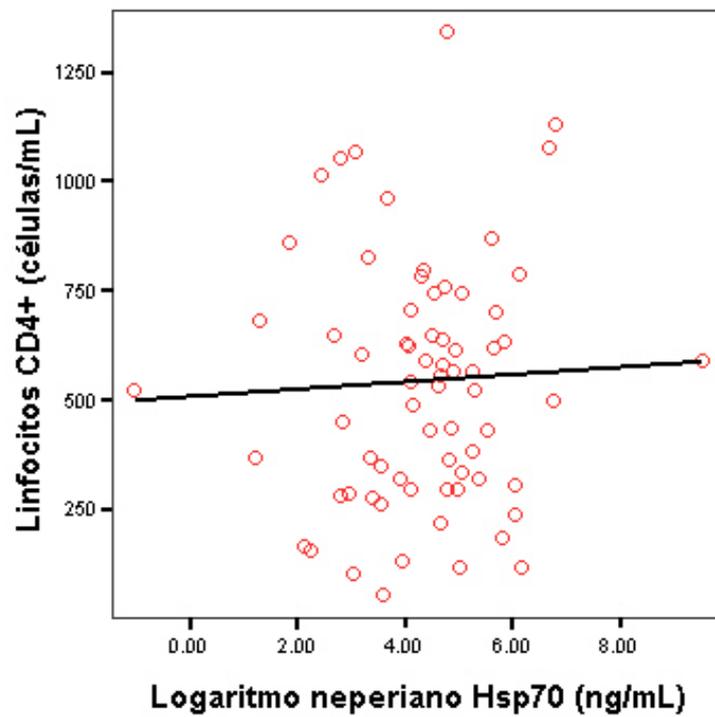


FIGURA 26. Relación entre Hsp70 (logaritmo neperiano) y linfocitos CD4⁺.
($r = 0.104$; $p = 0.431$)

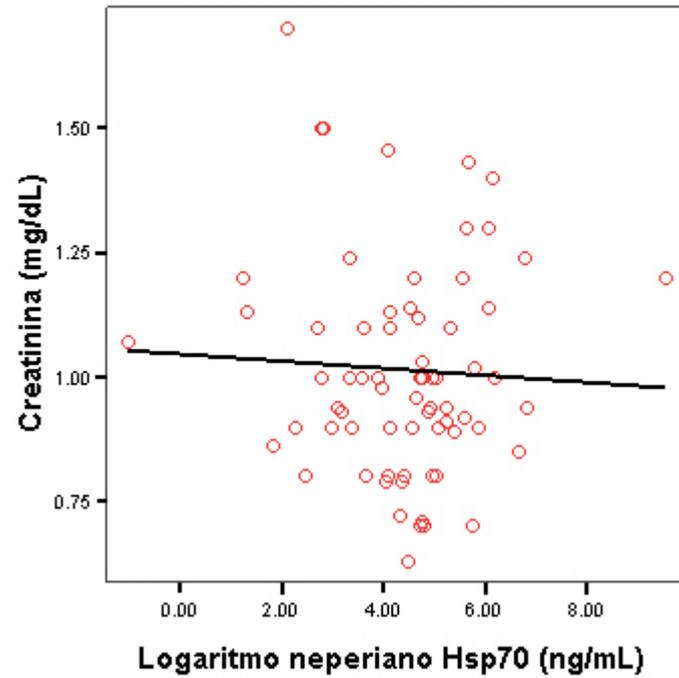


FIGURA 27. Relación entre el logaritmo neperiano de Hsp70 y creatinina.

($r = -0.181$; $p = 0.103$)

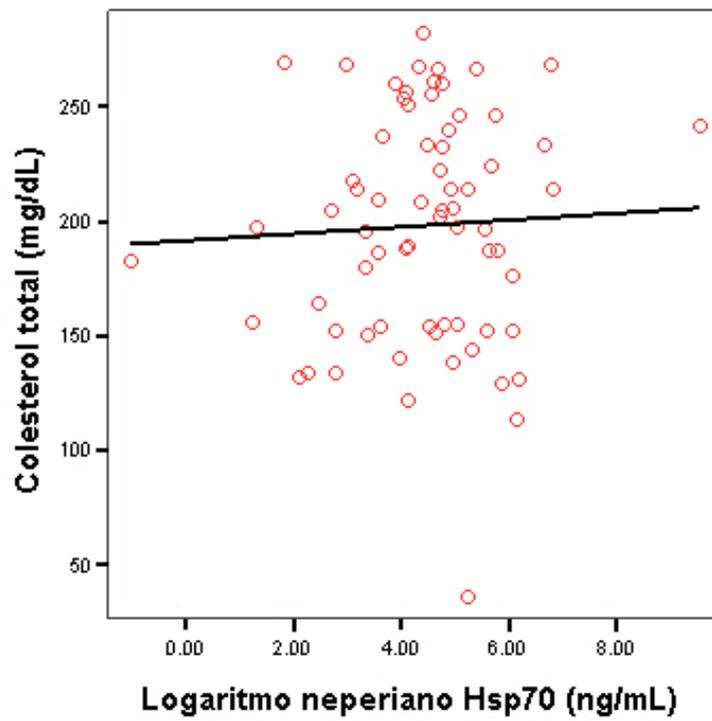


FIGURA 28. Relación entre logaritmo neperiano de Hsp70 y colesterol total
($r = -0.220$; $p = 0.094$)

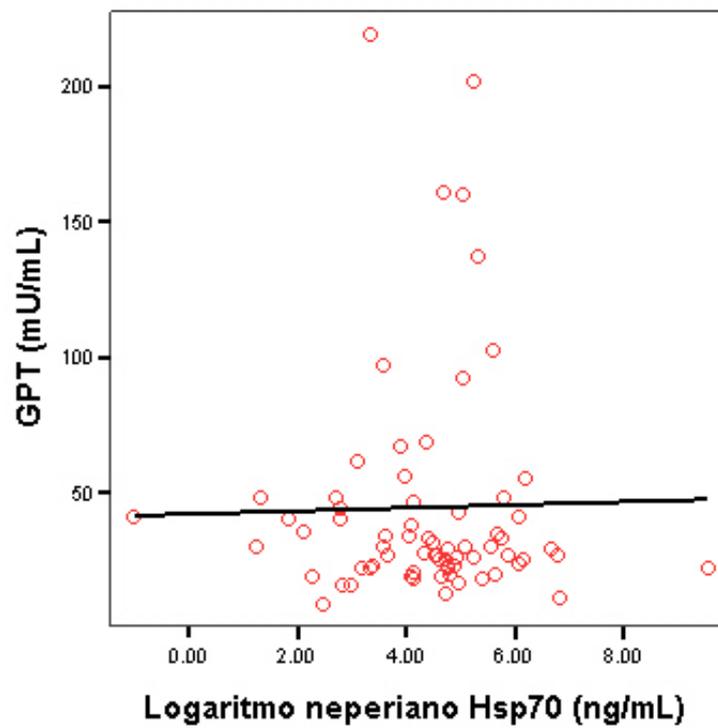


FIGURA 29. Relación entre Hsp70 (logaritmo neperiano) y GPT.

$(r = -0.181; p = 0.003)$

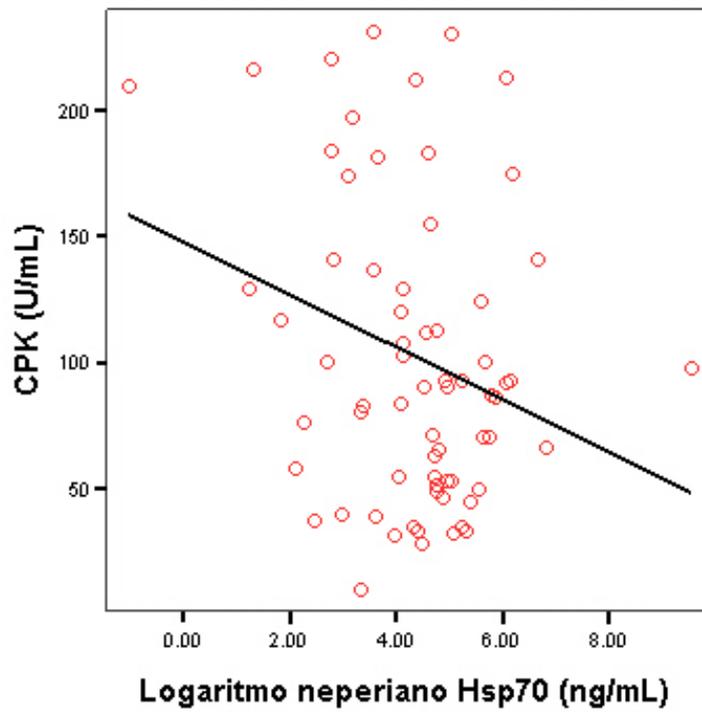


FIGURA 30. Relación entre Hsp70 (logaritmo neperiano) y CPK.

$(r = -0.378; p = 0.0005)$

En las Tablas 35 – 37 se exponen los resultados obtenidos al determinar los valores de Hsp70 estratificados por el tipo de tratamiento que reciben los pacientes en el momento de la obtención del suero. No se encontraron diferencias significativas en relación con el tratamiento o no con fármacos inhibidores de la proteasa, pero sí cuando se divide por la utilización o no de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos y no análogos de nucleósidos, en ambos casos con $p < 0.05$.

TABLA 35. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la proteasa.

TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PROTEASA	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	92	209.52	1463.11	1.66	2.42
<i>No</i>	82	76.14	153.22	2.22	2.36

Diferencias no significativas ($p = 0.281$).

TABLA 36. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos.

TRATAMIENTO CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	171	147.03	1077.61	1.89	2.40
<i>No</i>	3	125.56	178.09	4.03	1.56

Diferencias significativas ($p = 0.016$).

TABLA 37. Valores absolutos y logaritmo neperiano de Hsp70 en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos.

TRATAMIENTO CON NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	VALORES ABSOLUTOS DE HSP70		VALORES DEL LN HSP70	
		MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	61	322.13	1792.64	2.66	2.57
<i>No</i>	113	51.94	125.75	1.52	2.22

Diferencias significativas ($p = 0.033$).

Relación Hsp70 / CD4⁺

Los niveles de Hsp70 podrían ser dependientes de la concentración de linfocitos CD4⁺ circulantes por ello se exploró la posible asociación entre la razón Hsp70/CD4⁺ y el resto de las variables disponibles. En las tablas 38 - 47 se exponen los valores medios de este cociente, según el sexo, estado viroinmunológico de los pacientes, punto del fracaso virológico frente a situaciones de no fracaso, pacientes con fracaso frente a los estables y controles, estadio en el momento de inclusión y grupos de fármacos utilizados en el tratamiento.

En la tabla 38 se muestran los resultados de este cociente en función del sexo, variable para la que no se observan diferencias significativas.

TABLA 38. Valores de Hsp70/CD4⁺ en los pacientes estratificados según su sexo

SEXO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Varón</i>	140	0.33	2.05
<i>Mujer</i>	32	0.16	0.23

Diferencias no significativas ($p = 0.395$).

La tabla 39 recoge los valores estratificados según el estado viroinmunológico de los pacientes, siendo las diferencias no significativas, aunque cuando se excluyen los valores cero (Tabla 40) se obtienen diferencias significativas, que provienen de que el grupo de fracaso virológico está significativamente por encima del conjunto de los otros tres grupos ($p < 0.001$).

TABLA 39. Valores del cociente Hsp70/CD4⁺ en los pacientes estratificados según su estado inmunológico

GRUPOS DE PACIENTES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	75	0.51	2.78
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	12	0.20	0.41
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	23	0.23	0.41
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	62	0.09	0.17

FV: fracaso virológico; EVI: estables viroinmunológicamente.
Diferencias no significativas ($p=0.270$).

TABLA 40. Valores del cociente Hsp70/CD4⁺ en los pacientes estratificados según su estado inmunológico (los valores 0 de Hsp70 han sido excluidos)

GRUPOS DE PACIENTES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	32	1.19	4.19
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	3	0.80	0.47
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	10	0.53	0.49
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	29	0.19	0.21

FV: fracaso viroinmunológico; EVI: estables viroinmunológicamente.
Diferencias significativas ($p = 0.0007$).

Para el momento del fracaso virológico frente a los puntos en que no hay fracaso (Tabla 41), aunque se observan unas medias absolutas muy diferentes, no se alcanza una significación estadística, posiblemente debido a la gran variabilidad de las varianzas. Comparando los pacientes que han fracasado con los que no han fracasado, tampoco se obtuvieron diferencias significativas (Tabla 42).

TABLA 41. Valores de Hsp70/CD4⁺ en punto del fracaso virológico frente a situaciones de no fracaso

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	21	1.26	5.17
<i>No</i>	151	0.16	0.43

Diferencias no significativas ($p = 0.322$).

TABLA 42. Valores de Hsp70/CD4⁺ en pacientes con fracaso virológico frente a pacientes estables virológicamente y controles

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Situación de fracaso</i>	75	0.51	2.78
<i>Estables y controles</i>	97	0.14	0.29

Diferencias no significativas ($p = 0.289$).

Cuando se estratificó en función del estadio (Tabla 43), aún cuando las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, puede apreciarse una tendencia creciente en los valores medios del cociente estudiado.

TABLA 43. Valores de Hsp70/CD4⁺ en los diferentes estadios en el momento de inclusión

ESTADÍO EN EL MOMENTO DE INCLUSIÓN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>A</i>	61	0.11	0.19
<i>B</i>	51	0.24	0.66
<i>C</i>	60	0.55	3.06

Diferencias no significativas ($p = 0.338$).

No se encontraron asociaciones significativas entre el cociente Hsp70/CD4⁺ y valores de creatinina, colesterol total, o enzimas hepáticas GPT y CPK, tampoco cuando se relacionó con los niveles de CD4⁺, niveles de CD8⁺, o con el cociente CD4⁺/CD8⁺.

TABLA 44. Asociación entre los valores de Hsp70/CD4⁺ y las variables analíticas incluidas en el estudio.

VARIABLE	NIVELES DE SIGNIFICACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
<i>Creatinina</i>	$p = 0.450$	$r = 0.100$
<i>GPT</i>	$p = 0.219$	$r = - 0.162$
<i>CPK</i>	$p = 0.111$	$r = - 0.210$
<i>CHL-t</i>	$p = 0.940$	$r = 0.011$
<i>Linfocitos CD4⁺</i>	$p = 0.649$	$r = - 0.061$
<i>Linfocitos CD8⁺</i>	$p = 0.396$	$r = 0.112$
<i>Cociente CD4⁺ / CD8⁺</i>	$p = 0.162$	$r = - 0.185$

En relación con el tratamiento utilizado tampoco se pudo obtener ningún resultado significativo (Tablas 45 a 47).

TABLA 45. Valores de Hsp70/CD4⁺ en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la proteasa

TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PROTEASA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	91	0.44	2.53
<i>No</i>	81	0.14	0.27

Diferencias no significativas ($p = 0.282$).

TABLA 46. Valores de Hsp70/CD4⁺ en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	169	0.29	1.86
<i>No</i>	3	0.63	0.99

Diferencias no significativas ($p = 0.541$).

TABLA 47. Valores de Hsp70/CD4⁺ en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	60	0.54	3.05
<i>No</i>	112	0.17	0.51

Diferencias no significativas ($p = 0.346$).

En las tablas 48 – 56 se presentan los resultados correspondientes al análisis de la variable logaritmo neperiano Hsp70/CD4⁺. Utilizando esta transformación de la variable original se pudo disminuir la variabilidad, lo que permitió encontrar diferencias significativas en función del estado inmunológico de los pacientes (Tabla 48); diferencias que radican en que los valores del grupo CD4⁺ <200 son significativamente más bajos que los otros grupos, sin embargo no se obtuvieron resultados significativos para el momento o los pacientes con fracaso virológico.

TABLA 48. Valores de Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes estratificados según su sexo

SEXO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Varón</i>	54	-1.75	1.82
<i>Mujer</i>	20	-1.98	1.40

Diferencias no significativas ($p = 0.694$).

TABLA 49. Valores del Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes estratificados según su estado inmunológico

GRUPOS DE PACIENTES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	32	-1.63	1.80
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	3	-0.34	0.59
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	10	-1.06	1.10
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	29	-2.44	1.66

FV: fracaso virológico; EVI: estables viroinmunológicamente.

Diferencias significativas ($p = 0.0051$).

TABLA 50. Valores de Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en punto del fracaso virológico frente a situaciones de no fracaso

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	8	-1.22	2.25
<i>No</i>	66	-1.89	1.64

Diferencias no significativas ($p = 0.354$).

TABLA 51. Valores de Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en pacientes con fracaso virológico frente a pacientes estables virológicamente y controles

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Situación de fracaso</i>	32	-1.62	1.79
<i>Estables y controles</i>	42	-1.96	1.65

Diferencias no significativas ($p = 0.548$).

En relación con el estadio, las diferencias fueron casi significativas ($p < 0.1$), observándose como los valores logarítmicos del cociente disminuyen al progresar el estadio.

TABLA 52. Valores del Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en los diferentes estadios en el momento de inclusión

ESTADÍO EN EL MOMENTO DE INCLUSIÓN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>A</i>	30	-2.52	1.89
<i>B</i>	23	-1.52	1.40
<i>C</i>	21	-1.06	1.38

Diferencias no significativas ($p = 0.092$).

No se encontraron asociaciones significativas entre el logaritmo neperiano del cociente Hsp70/CD4⁺ y el logaritmo de la carga viral, creatinina, colesterol total. El enzima CPK muestra asociación significativa, siendo la relación en el sentido de que a

mayor nivel de CPK menor valor del logaritmo de Hsp70/CD4⁺. Sin embargo, se pierde la asociación significativa con la GPT. Tampoco existe asociación significativa para los CD8⁺, ni para el cociente CD4⁺/CD8⁺; la asociación si es significativa cuando se relaciona con los CD4⁺ y se mantiene al excluir los valores 0 de Hsp70 ($p = 0.080$; $r = -0.256$).

TABLA 53. Asociación entre logaritmo neperiano de Hsp70/CD4⁺ y las diferentes variables del estudio. Niveles de significación y coeficiente de correlación.

VARIABLE	NIVELES DE SIGNIFICACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
<i>Ln carga viral</i>	$p = 0.714$	$r = 0.050$
<i>Creatinina</i>	$p = 0.788$	$r = 0.036$
<i>GPT</i>	$p = 0.503$	$r = 0.036$
<i>CPK</i>	$p = 0.036$	$r = -0.279$
<i>CHL-t</i>	$p = 0.669$	$r = -0.057$
<i>Linfocitos CD4⁺</i>	$p = 0.054$	$r = -0.256$
<i>Linfocitos CD8⁺</i>	$p = 0.512$	$r = -0.057$
<i>Cociente CD4⁺/CD8⁺</i>	$p = 0.128$	$r = -0.057$

En función del tratamiento empleado sólo se observaron diferencias significativas para los pacientes tratados con inhibidores de la proteasa frente los no tratados con este tipo de fármacos ($p < 0.05$), pero no para el resto de tratamientos (Tablas 54 a 56).

TABLA 54. Valores del Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la proteasa

TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PROTEASA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	31	-1.21	1.47
<i>No</i>	43	-2.26	1.75

Diferencias significativas ($p = 0.038$).

TABLA 55. Valores del Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	71	-1.82	1.71
<i>No</i>	3	-1.75	2.05

Diferencias no significativas (p=0.953).

TABLA 56. Valores del Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	35	-1.90	1.73
<i>No</i>	39	-1.74	1.71

Diferencias no significativas (p=0.768).

Relación Hsp70 / CD8⁺

Se repitió nuevamente el análisis usando el cociente Hsp70/CD8⁺, tanto para los valores absolutos (Tablas 57-65) como para los valores logarítmicos (Tablas 66-73). Al igual que el análisis anterior no se encontraron diferencias significativas en relación con el estado inmunológico salvo cuando se excluyen los valores cero (Tabla 58), diferencias atribuibles a los valores de este cociente en los pacientes con fracaso virológico, significativamente más elevados que en el resto de pacientes ($p < 0.05$).

En esta variable Hsp70/CD8⁺, la relación con el estado inmunológico de los pacientes no es significativa (Tabla 57), pero cuando se excluyen los valores cero (Tabla 58) hay indicios de diferencias significativas entre grupos; estas provienen del grupo de fracaso virológico ya que está significativamente por encima del conjunto de los otros tres grupos ($p < 0.05$).

TABLA 57. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los pacientes estratificados según su estado inmunológico

GRUPOS DE PACIENTES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	75	0.20	1.04
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	12	0.03	0.06
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	23	0.10	0.18
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	61	0.07	0.13

FV: fracaso virológico; EVI: estables viroinmunológicamente.
Diferencias no significativas ($p = 0.174$).

TABLA 58. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los pacientes estratificados según su estado inmunológico (los valores 0 de Hsp70 han sido excluidos)

GRUPOS DE PACIENTES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	32	0.46	1.57
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	3	0.12	0.08
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	10	0.24	0.21
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	29	0.15	0.16

FV: fracaso virológico; EVI: estables viroinmunológicamente.
Diferencias significativas ($p = 0.063$).

TABLA 59. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los pacientes estratificados según su sexo

SEXO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Varón</i>	139	0.14	0.77
<i>Mujer</i>	32	0.09	0.13

Diferencias no significativas (p=0.589).

TABLA 60. Cociente Hsp70/CD8⁺. Niveles de significación y coeficiente de correlación con las diferentes variables del estudio.

VARIABLE	NIVELES DE SIGNIFICACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
<i>Tiempo de evolución</i>	$p = 0.345$	$r = - 0.125$
<i>Ln carga viral</i>	$p = 0.316$	$r = 0.133$
<i>Creatinina</i>	$p = 0.544$	$r = 0.080$
<i>GPT</i>	$p = 0.179$	$r = - 0.177$
<i>CPK</i>	$p = 0.051$	$r = - 0.255$
<i>CHL-t</i>	$p = 0.953$	$r = 0.008$
<i>Linfocitos CD4⁺</i>	$p = 0.595$	$r = 0.070$
<i>Linfocitos CD8⁺</i>	$p = 0.465$	$r = 0.048$
<i>Cociente CD4⁺/ CD8⁺</i>	$p = 0.627$	$r = - 0.065$

En el análisis del tiempo que lleva el paciente con la enfermedad y su relación con el cociente Hsp70/CD8⁺ no se obtiene una asociación significativa, así como tampoco con el logaritmo neperiano de la carga viral, creatinina, colesterol total, GPT, CPK, CD4⁺, CD8⁺ y cociente CD4⁺/CD8⁺ (Tabla 60).

Tampoco hay diferencias significativas entre el punto del fracaso y los puntos en que no hay fracaso (Tabla 61), ni entre los pacientes que han fracasado y los que no han fracasado (Tabla 62).

TABLA 61. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en punto del fracaso virológico frente a situaciones de no fracaso

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	21	0.52	1.95
<i>No</i>	150	0.07	0.14

Diferencias no significativas ($p = 0.290$).

TABLA 62. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en pacientes con fracaso virológico frente a pacientes estables virológicamente y controles

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Situación de fracaso</i>	75	0.20	1.04
<i>Estables y controles</i>	96	0.07	0.14

Diferencias no significativas ($p = 0.340$).

TABLA 63. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los diferentes estadios en el momento de inclusión

ESTADÍO EN EL MOMENTO DE INCLUSIÓN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>A</i>	60	0.07	0.12
<i>B</i>	51	0.11	0.23
<i>C</i>	60	0.20	1.16

Diferencias no significativas ($p = 0.579$).

TABLA 64. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la proteasa

TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PROTEASA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	90	0.16	0.95
<i>No</i>	81	0.09	0.18

Diferencias no significativas ($p = 0.521$).

TABLA 65. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	168	0.12	0.70
<i>No</i>	3	0.40	0.67

Diferencias no significativas ($p = 0.458$).

TABLA 66. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	60	0.25	1.15
<i>No</i>	111	0.06	0.17

Diferencias no significativas ($p = 0.204$).

En las siguientes tablas se presentan los resultados del análisis de la transformación logarítmica de la variable Hsp70/CD8⁺ (Tablas 67-75).

TABLA 67. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes estratificados según su estado inmunológico

GRUPOS DE PACIENTES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>FV</i>	32	-2.41	1.75
<i>EVI <200 CD4⁺/μL</i>	3	-2.22	0.61
<i>EVI 200-500 CD4⁺/μL</i>	10	-1.87	1.16
<i>EVI >500 CD4⁺/μL</i>	29	-2.81	1.75

FV: fracaso virológico; EVI: estables viroinmunológicamente.

Diferencias no significativas ($p = 0.423$).

TABLA 68. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes estratificados según su sexo

SEXO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Varón</i>	54	-2.50	1.78
<i>Mujer</i>	20	-2.44	1.32

Diferencias no significativas ($p = 0.913$).

TABLA 69. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en punto del fracaso virológico frente a situaciones de no fracaso

FRACASO VIROLÓGICO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>No</i>	66	-2.54	1.56
<i>Si</i>	8	-1.98	2.39

Diferencias no significativas ($p = 0.463$).

TABLA 70. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en pacientes con fracaso virológico frente a pacientes estables virológicamente y controles

FRACASO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Estables y controles</i>	42	-2.54	1.61
<i>Situación de fracaso</i>	32	-2.41	1.75

Diferencias no significativas ($p = 0.803$).

TABLA 71. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en los diferentes estadios en el momento de inclusión

ESTADÍO EN EL MOMENTO DE INCLUSIÓN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>A</i>	30	-2.90	1.91
<i>B</i>	23	-2.13	1.31
<i>C</i>	21	-2.28	1.54

Diferencias no significativas ($p = 0.454$).

El logaritmo neperiano del cociente no muestra asociación significativa con las siguientes variables cuantitativas: carga viral, CD4⁺, CD8⁺, cociente CD4⁺/CD8⁺, creatinina, colesterol total y GPT. En cambio, la enzima CPK muestra asociación significativa con el logaritmo del cociente Hsp70/CD8⁺. Estos resultados muestran que no hay una asociación significativa entre logaritmo neperiano de Hsp70/CD8⁺ y el tiempo de evolución de la enfermedad (Tabla 72).

TABLA 72. Cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano). Niveles de significación y coeficiente de correlación de las diferentes variables del estudio.

VARIABLE	NIVELES DE SIGNIFICACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
<i>Tiempo de evolución</i>	$p = 0.822$	$r = -0.030$
<i>Carga viral</i>	$p = 0.891$	$r = 0.018$
<i>Creatinina</i>	$p = 0.594$	$r = -0.071$
<i>GPT</i>	$p = 0.797$	$r = -0.071$
<i>CPK</i>	$p = 0.033$	$r = -0.283$
<i>CHL-t</i>	$p = 0.826$	$r = -0.029$
<i>Linfocitos CD4⁺</i>	$p = 0.601$	$r = -0.070$
<i>Linfocitos CD8⁺</i>	$p = 0.206$	$r = -0.168$
<i>Cociente CD4⁺/CD8⁺</i>	$p = 0.305$	$r = 0.136$

TABLA 73. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la proteasa

TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE LA PROTEASA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	31	-2.13	1.41
<i>No</i>	43	-2.74	1.79

Diferencias no significativas ($p = 0.224$).

TABLA 74. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	71	-2.47	1.63
<i>No</i>	3	-2.90	2.67

Diferencias no significativas ($p = 0.768$).

TABLA 75. Valores del cociente Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) en los pacientes en relación al tratamiento con fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

TRATAMIENTO CON NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
<i>Si</i>	35	-2.31	1.70
<i>No</i>	39	-2.64	1.62

Diferencias no significativas ($p = 0.528$).

Hsp70 en los puntos de muestreo para pacientes con fracaso virológico

Los resultados incluidos en las tablas 76 – 82 describen las diferencias entre los distintos puntos de muestreo estudiados, sólo en los pacientes que han fracasado. Se analizan las variables logaritmo neperiano de Hsp70, Hsp70/CD4⁺, logaritmo de Hsp70/CD4⁺, Hsp70/CD8⁺ y logaritmo de Hsp70/CD8⁺. El análisis de las mismas variables excluyendo los que tienen un valor de Hsp70 igual a cero.

TABLA 76. Valores de Hsp70 (logaritmo neperiano) entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	23	1.81	2.46
2	21	1.78	2.72
3	15	1.77	2.28
4	18	2.59	2.52

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas ($p = 0.459$).

TABLA 77. Valores del Hsp70/CD4⁺ entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	22	0.14	0.39
2	21	1.26	5.17
3	15	0.10	0.15
4	17	0.41	0.99

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas ($p = 0.403$).

TABLA 78. Valores del Hsp70/CD4⁺ (logaritmo neperiano) entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	8	-1.94	1.58
2	8	-1.22	2.25
3	7	-2.27	2.02
4	9	-1.20	1.40

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas ($p = 0.262$).

TABLA 79. Valores del Hsp70/CD8⁺ entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	22	0.07	0.15
2	21	0.52	1.95
3	15	0.05	0.10
4	17	0.10	0.17

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas ($p=0.458$).

TABLA 80. Valores del Hsp70/CD8⁺ (logaritmo neperiano) entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	8	-2.54	1.64
2	8	-1.98	2.39
3	7	-3.15	1.87
4	9	-2.09	1.02

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas ($p = 0.300$).

TABLA 81. Valores del Hsp70/CD4⁺ entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico (excluyendo los valores 0 de Hsp70)

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	8	0.38	0.58
2	8	3.31	8.28
3	7	0.21	0.17
4	9	0.78	1.28

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas ($p = 0.472$).

TABLA 82. Valores del Hsp70/CD8⁺ entre los diferentes puntos en los pacientes con fracaso virológico (excluyendo los valores 0 de Hsp70)

PUNTO DE MUESTREO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
1	8	0.19	0.21
2	8	1.36	3.10
3	7	0.11	0.13
4	9	0.19	0.20

Medida 3: fracaso virológico.
Diferencias no significativas (p=0.570).

Finalmente, en la Figura 31 se expone gráficamente la evolución de la variable Hsp70/CD4⁺ (con y sin exclusión de los valores 0), en los distintos puntos de muestreo estudiados en los pacientes con fracaso virológico. Puede observarse un incremento en el punto anterior al fracaso virológico.

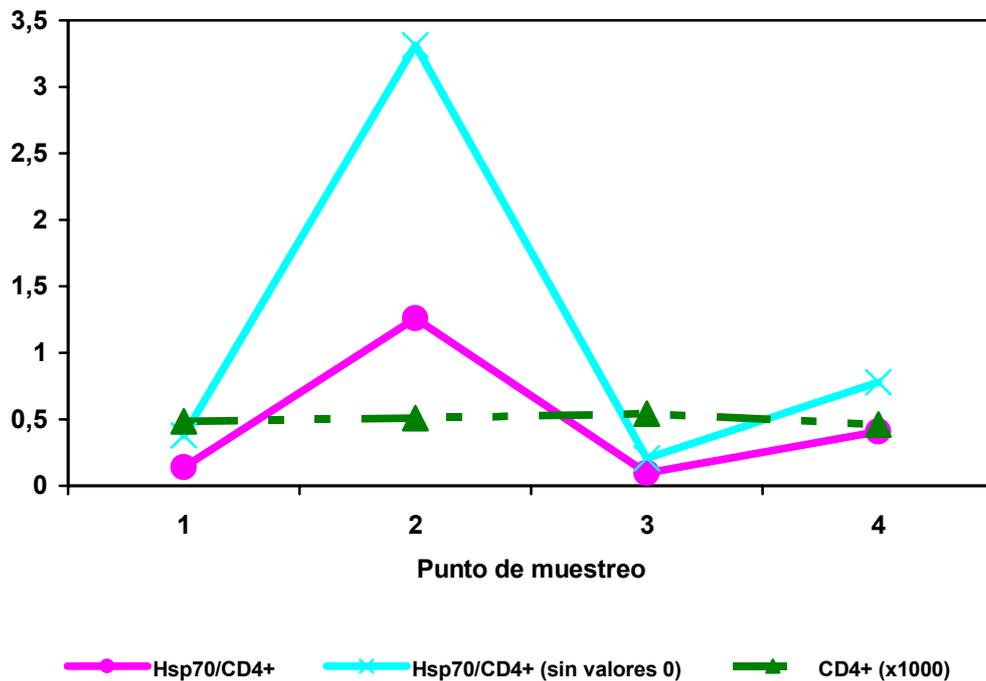


FIGURA 31. Estudio longitudinal de las variables Hsp70/CD4⁺ (con y sin exclusión de valores 0) y CD4⁺ en los puntos de muestreo para los pacientes con fracaso virológico.

Discusión

El papel de las proteínas de estrés en la infección por VIH y en pacientes que han desarrollado el SIDA no está suficientemente estudiado. Como se ha expuesto en la introducción se conocen muchos aspectos parciales del comportamiento de las proteínas de estrés en diversos procesos patológicos, pero no se ha llegado a conocer la evolución de estas proteínas en la mayor parte de ellos, ni en los que son de origen infeccioso ni en los que tienen etiología no infecciosa.

Las investigaciones centradas en los aspectos terapéuticos de la infección por VIH demuestran que las prostaglandinas de tipo A y J inhiben la replicación de VIH-1. Una característica peculiar de las prostaglandinas A1 es la inducción de Hsp70, factor al que se ha asociado la actividad antiviral de dichas prostaglandinas, y que favorece su unión a la proteína viral p53 (CARATTOLI y cols., 2000).

La propia infección por VIH produce un incremento directo de la síntesis de Hsp. Este fenómeno se ha demostrado *in vitro*, utilizando líneas celulares de linfocitos CD4⁺ (AGNEW y cols., 2003; FÜST y cols., 2005). Por otra parte, durante las fases tempranas de infección no aparece RNA genómico del virus hasta las 30 horas, mientras que el RNAm de Hsp70 puede detectarse ya en las 3-8 horas siguientes a la infección (WAINBERG y cols., 1997). Sin embargo, no se conoce bien la evolución de los niveles de estas proteínas inducibles en la historia natural del VIH, ni tampoco cómo se comportan cuando existen infecciones oportunistas, o el paciente es tratado con fármacos antirretrovirales. Se desconoce así mismo su relación con el nivel de linfocitos CD4⁺ y la carga viral.

SANTOMENNA y COLBERG-POLEY (1990), demuestran que la infección de fibroblastos diploides con citomegalovirus humano incrementa los niveles de Hsp70

dentro de las 16 horas siguientes a la infección, y que este aumento se mantiene durante las 72 horas postinfección, momento en que se alcanzan los mayores niveles. También se ha comprobado que la infección de células de ratón con virus herpes simple tipos 1 y 2 elevan los niveles de Hsp70 en las 4 primeras horas postinfección (KOBAYASHI y cols., 1994). Por analogía cabría esperar un aumento de la síntesis de Hsp70 cuando se produce la infección por VIH o bien cuando esta infección se reactiva, escapando al control farmacológico, tal y como ocurre durante el fracaso virológico.

El acúmulo creciente de datos juega a favor de que las proteínas Hsp desempeñan un papel esencial en la modulación de la respuesta inmunitaria (WELCH, 1993; WALLIN y cols., 2002; JOLLY y MORIMOTO, 2000; BRENNER y WAINBERG, 1999; KUMAZAKI, 1997) aunque es notable el desconocimiento existente sobre el comportamiento y la evolución de las Hsp en condiciones normales o en diferentes procesos patológicos. De ahí que la exploración de la posible correlación existente entre los niveles de linfocitos CD4⁺, carga viral, y proteínas Hsp70 se considere de enorme interés. La demostración de dicha correlación tendría una utilidad práctica inmediata, ya que haría posible la aplicación de las proteínas Hsp70 como predictoras del fracaso virológico, facilitando el seguimiento de la evolución clínica de los pacientes infectados por VIH, la evaluación de su pronóstico e incluso el ajuste y mantenimiento del tratamiento antirretroviral.

La decisión de centrar la investigación en pacientes VIH+ se adopta en principio por motivos de conveniencia, dada la existencia de una Seroteca del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Cecilio, en la que se conservan congeladas las muestras de suero obtenidas a lo largo del seguimiento clínico de los pacientes. Se contaba así con una alternativa para identificar fácilmente y de manera retrospectiva la población de estudio, que además ofertaba posibilidad de acceder a un número suficiente de muestras obtenidas de forma secuencial a lo largo de la evolución de los enfermos.

Inicialmente se estimó necesaria la identificación de al menos 50 pacientes con fracaso virológico y unos 90 pacientes estables viroinmunológicamente, procurando que estuvieran homogéneamente repartidos en función de los recuentos de linfocitos CD4⁺. Una vez analizados los listados existentes se identificaron como incluibles en el estudio 84 pacientes con fracaso virológico y 95 pacientes inmunológicamente estables para los que en principio no se conocía su situación inmunitaria (recuento de CD4⁺).

Tras la puesta en marcha del estudio surgieron diferentes obstáculos que limitaron el acceso a los sueros, en algunos casos por la escasez del suero disponible y en otros por la inclusión previa de los pacientes en otros estudios que impedía que se nos permitiera obtener la fracción necesaria de suero para la determinación de Hsp70.

Finalmente se logró incluir un total de 61 pacientes, de los que 25 habían sufrido un fracaso virológico durante el periodo de estudio. Su distribución por sexo y edad es superponible a la distribución epidemiológica por sexo y edad de los 1888 casos diagnosticados en 2003, e igualmente en cuanto a la distribución de los mecanismos de infección declarados (B.E.S., 2004; HERRUZO y cols., 2001; BLANCO y cols., 1996).

Para la cuantificación de Hsp70 se ha utilizado el método ELISA, si bien hemos preferido el método en el que se fijan los anticuerpos a la placa de microtiter y se preparan los reactivos (CEDERHOLM y cols., 2004; POCKLEY y cols., 2003; POCKLEY y cols., 2002; POCKLEY y cols., 1998), ya que el kit comercializado (Stressgen Biotechnologies Inc., Victoria, British Columbia, Canada), mostró peores resultados en los ensayos iniciales.

El análisis estadístico que se aplicó a los resultados estuvo condicionado por dos factores fundamentales, en primer lugar el escaso tamaño muestral y en segundo lugar la gran variabilidad de los resultados obtenidos que supuso la existencia de

varianzas heterogéneas. Esta variabilidad no es un fenómeno aislado, sino que se encuentra igualmente en los resultados de otros investigadores que determinan Hsp70 en diferentes contextos. En un estudio realizado sobre 26 pacientes con lupus eritematoso sistémico, las concentraciones de Hsp70 mostraron una media de 239.4 ng/mL y una desviación estándar de 367.9 ng/mL (CEDERHOLM y cols., 2004); las concentraciones de Hsp70 en 47 varones y 45 mujeres normales mostraron rangos de 0 – 13380 ng/mL y 0 – 18550 ng/mL respectivamente (POCKLEY y cols., 1998); en un estudio realizado en 55 mujeres con preeclampsia, los niveles de Hsp70 en suero fueron de 2.82 ng/mL con una desviación estándar de 8.33 ng/mL (JIRECEK y cols., 2002). Para obviar este inconveniente se han empleado transformaciones logarítmicas (logaritmo neperiano del valor de la variable más 1, con objeto de incluir en el análisis estadístico los valores 0); estos valores, si bien dificultan la lectura de los resultados facilitan su comparación estadística, al disminuir la variabilidad y aumentar el grado de significación.

El 34.4 % de los enfermos se encontraban en el momento de su inclusión en el estudio en la categoría clínica C3, es decir, con un nivel de linfocitos CD4⁺ <200 células/ μ L y alguna de las enfermedades marcadoras de caso de SIDA. A dicha categoría pertenecían el 48% de los pacientes con fracaso virológico posterior y tan solo el 25% de los pacientes se mantuvieron estables a lo largo del seguimiento.

Se han analizado todas las variables clínicas y bioquímicas disponibles, sin que se hayan detectado variaciones significativas en los diferentes puntos de muestreo para ninguna de ellas, exceptuando lógicamente la carga viral que fue el parámetro utilizado para la definición del fracaso virológico. Tampoco entre los pacientes pertenecientes a los diferentes estadios viroinmunológicos se observaron diferencias significativas en dichas variables.

En conjunto se ha logrado analizar un total de 174 sueros, de forma consistente con los datos expuestos relativos a los pacientes, el mayor porcentaje de sueros (35.1 %) correspondían a un estadio C3; el 97.7% de ellos fueron obtenidos en

situación de tratamiento antirretroviral, y en casi el total de los casos (97.7 %) con una combinación de fármacos en la que se incluyen inhibidores de la transcriptasa análogos de nucleósidos.

Los niveles de proteína Hsp70 detectados oscilaron entre 0 y 14032.14 ng/mL. Los valores más elevados se alcanzan en el grupo con fracaso virológico, mientras que los límites superiores en el resto de los pacientes fueron 343 ng/mL para los controles sanos, y de 154 a 906 ng/mL para los pacientes viroinmunológicamente estables. Los valores medios mostraron cifras casi 4 veces superiores en los pacientes con fracaso virológico que en el resto, si bien las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, como ya se ha comentado debido a la gran variabilidad de los valores obtenidos.

El aumento de los valores de Hsp en diversas condiciones patológicas en relación a sujetos sanos ha sido previamente descrito, tanto en procesos infecciosos (PANAYI y cols., 2004; WRIGHT y cols., 2000), como en pacientes traumatológicos (HASHIGUCHI y cols., 2001). En este estudio, la concentración media de la proteína Hsp70 detectada fue unas dos veces superior en los pacientes que en los controles, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, es más, como se aprecia en la Tabla 29 toda la diferencia se debe a los pacientes con fracaso virológico, presentando los enfermos estables valores medios similares a los obtenidos en los controles.

Previamente se han descrito valores de Hsp superiores en mujeres (POCKLEY y cols., 1998). En la serie estudiada, los valores detectados fueron superiores en varones que en mujeres, con diferencias significativas cuando el análisis se centra en la transformación logarítmica. Esto es debido a que el 92 % de fracasos virológicos corresponden a pacientes varones (Tabla 16), y en el fracaso virológico se alcanzan niveles de Hsp70 muy altos (Tabla 93). Si se excluyen los sueros correspondientes al fracaso virológico, las concentraciones medias muestran valores superiores en mujeres, 74.01 ± 152.82 ng/mL, que en varones, 58.39 ± 139.40 ng/mL, sin que

lleguen a detectarse diferencias significativas. Cuando se analizan exclusivamente los datos obtenidos en controles nuestros resultados son consistentes con los proporcionados en la literatura científica, confirmando una concentración media significativamente superior en mujeres (113.40 ± 107.10) que en varones (10.06 ± 17.38) ($t = -3.279, p = 0.004$).

También se ha señalado una disminución de los valores de proteínas de estrés en relación con la edad que podría indicar una pérdida de la capacidad de adaptación ante condiciones anómalas (BRENNER y WAINBERG, 1999; KIANG y TSOKOS, 1998). En nuestra serie de pacientes no se detectan diferencias en función de la edad, lo que puede deberse a un rango de edades relativamente limitado o bien al hecho de que el envejecimiento de los pacientes VIH+ está condicionado fundamentalmente por otros factores como pueden ser la desnutrición, la existencia de infecciones o tumores intercurrentes, el tiempo de evolución de la enfermedad, etc. Por otra parte, no hay una tendencia clara de las concentraciones de Hsp70 en relación al tiempo de evolución, y no existió correlación lineal significativa ($p = 0.338; r = -0.110$), lo cual parece lógico ya que los datos sugieren que los niveles de Hsp70 son más dependientes de la situación viroinmunológica que del tiempo de evolución de la enfermedad.

El fracaso virológico se asoció a valores medios de Hsp unas 10 veces superiores a los obtenidos en los sueros correspondientes a momentos de estabilidad viroinmunológica. A pesar de ello las diferencias no llegaron a ser significativas, ni en el análisis de los valores absolutos ni cuando las comparaciones se realizaron utilizando las transformaciones logarítmicas. Los análisis estadísticos no nos permiten descartar que las diferencias observadas se deban exclusivamente al azar, sin embargo la magnitud de las diferencias nos permite especular con ellas. Desde un punto de vista clínico, el fracaso virológico que aparece en sujetos previamente controlados indica el desarrollo de resistencias. De forma análoga a lo descrito por CORONATO y cols. (1999) y HU y cols. (2002), que señalan un aumento de los valores de las

proteínas de estrés en pacientes neoplásicos cuando aparecen resistencias frente a los tratamientos antineoplásicos, el aumento de los valores de Hsp70 detectado en los momentos de fracaso virológico podría atribuirse a la aparición de resistencias frente a los fármacos antirretrovirales. Por otra parte, por lo que sabemos en relación con las funciones intracelulares de las proteínas de estrés (NOLLEN y MORIMOTO, 2002^a; KIANG y TSOKOS, 1998; MADIGAN y cols., 1997^a), su aumento podría ser uno de los mecanismos celulares de adaptación frente a una agresión específica, en este caso el fármaco antirretroviral. Si nos atenemos a los datos objetivos no podemos afirmar que el fracaso virológico se asocie a un incremento de las proteínas de estrés, pero tanto por la posible significación clínica de los resultados obtenidos como por la existencia de analogía con otros procesos y la plausibilidad biológica descrita consideramos que tampoco se puede descartar dicha asociación, y nuestra conclusión fundamental es que se necesita aumentar el tamaño de la muestra para pronunciarse definitivamente en este sentido.

No se han encontrado diferencias significativas en los valores de Hsp70 en pacientes tratados o no con inhibidores de la proteasa, pero curiosamente, sí se detectan diferencias cuando se estratifica por la utilización o no de inhibidores de la transcriptasa inversa, tanto para análogos de nucleósidos como para el tratamiento con no análogos. No hemos encontrado referencias externas que nos permitan comparar estos hallazgos, y la limitación de datos referidos a la evolución clínica nos impide proporcionar una explicación razonable, por ejemplo, podría influir el mecanismo de acción y la aparición de efectos secundarios de los diferentes fármacos.

Sabemos que el porcentaje de pacientes tratados con inhibidores de la proteasa fue superior entre los pacientes con fracaso virológico que entre los que se mantuvieron estables en todos los puntos de muestreo, mientras que no se detectaron diferencias en los porcentajes de tratamiento con inhibidores de la transcriptasa inversa análogos o no análogos de nucleósidos. Cuando se estudian exclusivamente los sueros correspondientes a momentos de estabilidad (sin fracaso virológico) sólo

para los tratados con inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos se detectaron diferencias significativas, en el sentido de obtener concentraciones medias superiores en los pacientes tratados con este grupo de fármacos.

Se exploró la existencia de correlación entre los niveles de Hsp70 cuantificados y los parámetros analíticos disponibles para cada uno de los puntos de muestreo. Se ha detectado la existencia de correlación estadísticamente significativa con la GPT y la CPK, y casi significativa con el colesterol total. En los tres casos la correlación es negativa, en el sentido de que a mayor valor de estos parámetros menor es el valor del logaritmo neperiano de la proteína Hsp70. La alteración de estos parámetros se considera de etiología multifactorial, y entre los factores asociados se incluyen los tratamientos antirretrovirales (JAIN y cols., 2001; FELLAY y cols., 2001). Puesto que también se han detectado asociaciones con algunos de los tratamientos, estaría indicado realizar un análisis multivariable que permitiera explicar la contribución de cada uno de estos factores corrigiendo el efecto de los restantes. No obstante, el limitado número de casos, aconseja posponer este tipo de análisis hasta que se pueda ampliar la muestra.

Aun cuando los datos no son en absoluto concluyentes, esta observación sugiere que al igual que la determinación de las enzimas CPK y GPT, los valores de Hsp70 podrían tener valor diagnóstico y pronóstico, o al menos una aplicación en el seguimiento de los pacientes tratados, no solo en relación a la predicción de posibles fracasos sino también para la detección de efectos adversos del tratamiento. Fenómenos ambos que deberán ser estudiados con mayor profundidad.

Es notable que los valores medios de recuento de CD4⁺ en la situación de fracaso virológico no son muy bajos en comparación con los obtenidos en situación de estabilidad. En los sueros con carga viral mayor de 50 copias/mL se obtiene un valor medio de 373.56 ± 249.18 CD4⁺/μL, mientras que los que tienen carga viral menor de 50 copias/mL o indetectable muestran un valor medio de 539.18 ± 321.67 CD4⁺/μL, diferencias que no son significativas. Incluso puede observarse en la Tabla

23, el punto de muestreo 3, que representa el momento de fracaso virológico, tiene un recuento de CD4⁺ que no muestra grandes diferencias con el resto de situaciones viroinmunológicas. Esto parece indicar que el recuento de CD4⁺, que pronostica adecuadamente la situación inmunológica, no es un buen indicador del fracaso virológico. No se han detectado asociaciones entre los recuentos de linfocitos CD4⁺ o CD8⁺ y los valores de Hsp70, no obstante se ha evaluado el comportamiento de la relación entre la proteína Hsp70 y cada una de estas poblaciones linfocitarias.

En el primer caso, el cociente Hsp70/CD4⁺ fue significativamente superior en los pacientes con fracaso virológico, aunque sólo cuando se excluyeron los valores cero, al igual que cuando se utilizó el logaritmo neperiano de esta variable. Sin embargo, no ocurrió igual cuando se comparan los sueros correspondientes al momento de fracaso con el resto. También se detectó una correlación significativa con los valores de CPK.

Para los diferentes estadios en el momento de inclusión en el estudio, la relación Hsp70/CD4⁺, mostró unos resultados más coherentes que la concentración de Hsp70: cuanto peor era la situación clínica del paciente mayor fue el valor de esta variable transformada.

En relación con el tratamiento, se observaron diferencias significativas en el logaritmo neperiano del cociente Hsp70/CD4⁺ sólo entre los pacientes tratados o no con inhibidores de la proteasa. Estas diferencias pueden atribuirse en parte a la existencia de recuentos de linfocitos CD4⁺ significativamente inferiores entre los pacientes sometidos a tratamiento con inhibidores de la proteasa, mientras que no existieron diferencias en dichos recuentos en función del resto de tratamientos.

Los resultados obtenidos para el cociente Hsp70/CD8⁺ fueron similares a los que acabamos de comentar al establecer grupos en función de la situación viroinmunológica. Cuando se excluyeron los valores cero, el resultado del cociente fue significativamente superior en los pacientes con fracaso virológico que en el resto.

También como en el caso anterior se detectó una correlación significativa con los valores de CPK.

Finalmente, la evolución de los niveles de Hsp70 durante el periodo de seguimiento de los pacientes, muestra como se produce un pico en los pacientes con fracaso virológico correspondiente al momento en el que se produce éste, volviendo a los niveles previos cuando se vuelve a estabilizar la carga viral. Estos resultados, que no llegaron a ser significativos, no se detectaron cuando se analizó la transformación logarítmica de la Hsp70, sin embargo, la variable Hsp70/CD4⁺ mostró un incremento en la situación anterior al fracaso (punto 2), que no podía atribuirse a una disminución de los CD4⁺, puesto que sus niveles medios no presentan grandes variaciones en los distintos puntos, lo que hace pensar que esta variable podría ser utilizada como un marcador útil para el pronóstico y la prevención del fracaso viroinmunológico.

El estudio realizado no agota una línea de investigación, sino que además de alentar a su continuación, en estrecha colaboración con los clínicos, abre la posibilidad de nuevos proyectos relacionados con el comportamiento de las Hsp70 en otras enfermedades infecciosas y crónicas. Concretamente consideramos que el estudio del comportamiento de las Hsp puede tener utilidad:

- A nivel clínico para establecer el pronóstico y seguimiento de los pacientes, ya sea en enfermedades infecciosas como crónicas.
- A nivel poblacional como herramienta de vigilancia epidemiológica de enfermedades agudas y crónicas.
- En salud ambiental como biomarcador de exposición en poblaciones sometidas a factores de riesgo ambientales.

Conclusiones

Del estudio de los niveles de Hsp70 en pacientes infectados por VIH, en relación con su situación viroinmunológica y otras variables de interés epidemiológico, se pueden obtener las conclusiones que se exponen a continuación.

1. Los valores de concentración de Hsp70 detectados son del orden de 10 veces superiores en los pacientes en situación de fracaso viroinmunológico frente a los virológicamente estables. Aun cuando no puede descartarse estadísticamente que las diferencias observadas sean debidas al azar, la confirmación de los resultados podrían tener gran relevancia clínica.
2. En pacientes con carga viral menor de 50 copias/mL o indetectable no se observaron diferencias clínicas ni estadísticas en los valores de Hsp70; ni entre diferentes categorías establecidas en función del recuento de linfocitos CD4⁺, ni dentro de una misma categoría a lo largo del tiempo.
3. La existencia de una correlación significativa entre los niveles de Hsp70 y las enzimas CPK y GPT, junto a las diferencias en los niveles de esta proteína observadas en relación al tipo de tratamiento antirretroviral, habla a favor de la posible utilidad de esta proteína, no sólo como factor pronóstico, sino también para la monitorización del tratamiento y la

- detección de efectos adversos, aspectos que habrá que analizar con mayor profundidad.
4. Mientras que en los pacientes en los que la carga viral permanece estable a lo largo del tiempo de seguimiento los niveles de Hsp70 se mantienen constantes, en los pacientes que muestran un fracaso virológico se observa un incremento en las concentraciones séricas de esta proteína que coincide con dicho fracaso.
 5. Las concentraciones séricas de Hsp70 son superiores en los pacientes con tratamiento antirretroviral, lo que podría indicar la utilidad de esta proteína para el ajuste y mantenimiento de este tratamiento, aunque sería necesario profundizar en este aspecto mediante el diseño y desarrollo de estudios adecuados.
 6. El cociente Hsp70/CD4^+ presenta los máximos valores en las peores situaciones relativas a fracaso viroinmunológico y estadio clínico de la enfermedad; en el estudio de la evolución temporal en los pacientes con fracaso virológico, el cociente Hsp70/CD4^+ presenta los valores elevados en el punto anterior al fracaso virológico. Estos hechos sugieren que esta variable transformada podría tener un gran valor como marcador pronóstico en el sujeto VIH+.
 7. La evaluación de la utilidad de las concentraciones de Hsp70 como biomarcador de evolución clínica, virológica e inmunológica de los pacientes VIH+ requiere el estudio de una población más numerosa a través de un período de tiempo más prolongado. La ampliación y continuación de este estudio permitirá pronunciarse en este sentido.

Bibliografía

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M. y SHER, A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**: 787-703.

ADAMS, G.; ADDO, M.; ALDOVINI, A. y 129 cols. (2001): Consensus statement on antiretroviral treatment for AIDS in poor countries. *Topics in HIV Medicine*, **9**: 14-26.

AGNEW, L. L.; KELLY, M.; HOWARD, J.; JEGANATHAN, S.; BATTERHAM, M.; FFRENCH, R. A.; GOLD, J. y WATSON, K. (2003): Altered lymphocyte heat shock protein 70 expression in patients with HIV disease. *AIDS*, **17**: 1985-1988.

AIDSSA (1998): Natural resistance to HIV/AIDS. *National Institute for Communicable Disease of the National Health Laboratory Service*, **7(2)**.
www.niv.ac.za/virusa/aidsa/aid63.htm

ARORA, D. R.; GAUTAM, V. y ARORA, B. (2003): HIV-1 therapeutic vaccine: a ray of hope. *Indian J. Med. Microbiol.*, **21**: 225-232.

BAILEY, J.; BLANKSON, J. N.; WIND-ROTOLO, M.; y SILICIANO, R. F. (2004): Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr. Opin. Immunol.*, **16**: 470-476.

BARE, P.; MASSUD, I.; BELMONTE, L.; CORTI, M.; VILLAFANE, M.; PÉREZ BIANCO, R.; DE TEZANOS-PINTO, M.; DE BRACCO, M. M.; RUIBAL-ARES, B. (2003): HCV recovery from peripheral blood mononuclear cell culture supernatants derived from

HCV-HIV co-infected haemophilic patients with undetectable HCV viraemia. *Haemophilia*, **9(5)**: 598-604.

BARTZ, S. R.; PAUZA, C. D.; IVANYI, J.; JINDAL, S.; WELCH, W. J. y MALKOVSKY, M. (1994): An hsp60 related protein is associated with purified HIV and SIV. *J. Med. Primatol.*, **23**: 151-154.

B.E.S. (2002): Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Situación a 31 de diciembre de 2001. *B.E.S.*, **10**: 1-8.

B.E.S. (2002): Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Situación a 30 de junio de 2002. *B.E.S.*, **10**: 121-128.

B.E.S. (2003): Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Situación a 30 de junio de 2003. *B.E.S.*, **11**: 293-296.

B.E.S. (2004): Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Situación a 30 de junio de 2004. *B.E.S.*, **12**: 137-148.

BHAGAT, L.; SINGH, V. P.; SONG, A. M.; VAN ACKER, G. J. D.; AGRAWAL, S.; STEER, M. L. y SALUJA, A. K. (2002): Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology*, **122**: 156-165.

BINDER, R. J.; VATNER, R. y SRIVASTAVA, P. (2004): The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*, **64**: 442-451.

BLANCO GÓNZALEZ, M. I.; GARCÍA LÓPEZ, J. A.; DAMAS FERNÁNDEZ, M. y CEREZO GALÁN, A. (1996): Perfil fármaco terapéutico en pacientes ingresados en la Unidad de Infecciosos del Hospital Universitario de Granada. *Farm. Hosp.*, **20**: 314-318.

BLOMQUIST, D. V.; GREEN, P.; LAIDLAW, S. M.; SKINNER, M. A.; BORROW, P. y DUARTE, C. A. (2002): Induction of a strong HIV-specific CD8(+) T cell response in mice using a fowlpox virus vector expressing an HIV-1 multi-CTL-epitope polypeptide. *Viral Immunol.*, **15**: 337-356.

BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DE LA COMUNIDAD DE MADRID (2003): Vigilancia epidemiológica de la infección por VIH/SIDA en la Comunidad de Madrid hasta el 31 de diciembre de 2002. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*, **9(5)**: 3-90.

BOND, J. A.; GONZALEZ, C. R. M., BRADLEY, B. P. (1993): Age-dependent expression of proteins in the cladoceran *Daphnia magna* under normal and heat-stress conditions. *Comp. Biochem. Phys. B.*, **106**: 913-917.

BIERKENS, J. G. E. A. (2000): Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, **153**: 61-72.

BONFANTI, P.; RICCI, E.; LANDONIO, S.; VALSECCHI, L.; TIMILLERO, L.; FAGGION, I.; QUIRINO, T. (2001): Predictors of protease inhibitor-associated adverse events. *Biomed. Pharmacother.*, **55**: 321-324.

BOSHOFF, T.; LOMBARD, F.; EISELEN, J. J.; BORNMAN, J. J.; BACHELET, M.; POLLA, B.S. y BORNMAN, L. (2000): Differential basal synthesis of Hsp70/Hsc70 contributes to interindividual variation in Hsp70/Hsc70 inducibility. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**:1317-1325.

BRENNER, B. G. y WAINBERG M. A. (1999): Heat shock proteins: novel therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type I infection. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, **7**: 80-90.

BRENNER, B. G. y WAINBERG M. A. (2001): Heat shock protein-based therapeutic tools for HIV-infection? *Expert Opin. Biol. Th.*, **1**: 67-77.

BROCHE VALLE, F.; CÉSPEDES MIRANDA, E. M. y GARCÍA PIÑEIRO, J. C.(1999): Las proteínas de estrés en la biología molecular de la célula. *B.E.B.*, **18**: 98-107.

BUENZ, E. J.; BADLEY, A. D. (2004): Impact of mitochondrial regulation of apoptosis on the pathogenesis and treatment of HIV-1-induced immunodeficiency. *Mitochondrion*, **4**: 235-254.

CAMPISI, J.; LEEM, T. H. y FLESHNER, M. (2003): Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell. Stress Chapero.*, **8**: 272-286.

CARATTOLI, A.; FORTINI, D.; ROZERA, C. y GIORGI, C. (2000): Inhibition of HIV-1 transcription by cyclopentenone prostaglandin A(1) in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Reg. Homeos. Ag.*, **14**: 209-216.

CARPIO, F. F. (2001): Social, cultural, and epidemiologic considerations in HIV disease management in US latino populations. *Topics in HIV Medicine.*, **9**: 34-36.

CAUX, C.; BURDIN, N.; GALIBERT, L.; HERMANN, P.; RENARD, N.; SERVETDELPRAT, C. y BANCHEREAU, J.: Functional CD40 on B-lymphocytes and dendritic cells *Res. Immunol.*, **145**: 235-239.

CDC (1992): 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR*, **December 18**, 41 (RR-17).

CDC (1999): CDC guidelines for national human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR*, **December 10**, 48 (RR-13).

CDC (2002): Guideline for the use of antiretroviral agents in HIV infected adults and adolescence. *MMWR*, **May 17**, (RR-07).

CDC (2004): Tratamiento de abuso de sustancias para los usuarios de drogas inyectables: una estrategia con múltiples beneficios.

www.cdc.gov/spanish/udi/substanceabuse/treatment.htm.

CECILIA, D.; KLEEBERGER, C.; MUNOZ, A.; GIORGI, J. V. y ZOLLA-PAZNER, S. (1999): A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. *J. Infect. Dis.*, **179**: 1365-1374.

CEDERHOLM, A.; SVENUNGSSON, E.; STENGEL, D.; FEI, G.; POCKLEY, A. G.; NINIO, E. y FROSTEGÅRD, J. (2004): Platelet-activating factor-acetylhydrolase and other novel risk and protective factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **50**: 2869-2876.

CELLA, M.; SCHEIDEGGER, D.; PALMERLEHMANN, K.; LANE, P.; LANZAVECCHIA, A. y ALBER, G. (1996): Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.*, **184**: 747-752.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA (2003): Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Registro Nacional de Casos de SIDA. Actualización a 31 de diciembre de 2003. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología. Informe Semestral nº 2, Año 2003.

CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA (2004): Vigilancia epidemiológica del SIDA en España. Situación a 30 de junio de 2004. *B. E. S.*, **12**: 137-148.

CHUN, T. W.; STUYVER, L.; MIZELL, S. B. ET ALL (1997): Presence on an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**: 13193-13197.

CIOCCA, D.R.; FUQUA, S.; LOCKLIM, S.; TOFT, D.O., WELCH, W.J. y MCGUIRE, W. L. (1992): Response of human breast-cancer cells to heat-shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.*, **52**: 3648-3654.

CONSEJERÍA DE SALUD DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA (1996): Decreto 66/1996 de 13 de febrero por el que se constituye en la Comunidad Autónoma de Andalucía el Sistema de Vigilancia Epidemiológica y se determinan las normas del mismo. BOJA 19 marzo 1996.

CONSEJERÍA DE SALUD DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA (1997): Orden de 19 de diciembre de 1996 por la que se desarrolla el sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía y se establece la relación de Enfermedades de Declaración Obligatoria. BOJA 9 enero 1997.

CONSEJERÍA DE SALUD DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA (2004): Vigilancia Epidemiológica del SIDA. www.juntadeandalucia.es.

CONSEJERÍA DE SALUD DE LA JUNTA DE ANDALUCÍA (2002): Proceso asistencial integrado. VIH/SIDA. www.juntadeandalucia.es.

COOPER, C. L.; PARBHAKAR, M. A. y ANGEL, J. B. (2002): Hepatotoxicity associated with antiretroviral therapy containing dual versus single protease inhibitors in

individuals coinfectd with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.*, **34**: 1259-1263.

CORONATO, S.; DI GIROLAMO, W.; SALAS, M.; SPINELLI, O. y LAGUENS, G. (1999): Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina*, **59**: 477-486.

DE NAGEL, D. C. y PIERCE, S. K. (1993): Heat shock proteins in immune responses. *Crit. Rev. Immunol.*, **13**: 71-81.

DEL AMO, J.; BELZA, M. J.; CASTILLO, S. y LLÁCER, A. (2001): Prevención del VIH/SIDA en inmigrantes y minorías étnicas. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.

DHHS (2004): Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. US Department of Health and Human Services (DHHS), October 29. <http://aidsinfo.nih.gov>

DIETERICH, D. T (2003): Managing antiretroviral-associated liver disease. *J. Acq. Immun. Def. Synd.*, **34**: S34-S39.

DIETERICH, D. T.; ROBINSON, P. A.; LOVE, J. y STERN, J. O. (2004): Drug-induced liver injury associated with the use of non nucleoside reverse-transcriptase inhibitors. *Clin. Infect. Dis.* **38**: S80-S89.

DOMÍNGUEZ CARMONA, M. y DOMÍNGUEZ DE LA CALLE, J. C. (1991): Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). In PIÉDROLA GIL y cols. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. Pp: 604-671. 9ª ed. Masson-Salvat *Medicina*. Barcelona.

ENA, J.; AMADOR, C.; BENITO, C.; FENOLL, V. y PASQUAU, F. (2003): Risk and determinants of developing severe liver toxicity during therapy with nevirapine and

efavirenz containing regimens in HIV- infected patients. *Int. J. Std. AIDS*. **14**: 776-781.

FAUCI, A. S. y CLIFFORD LANE, H. (2005): Human immunodeficiency virus disease: AIDS and related disorders. In HARRISON´S: *Principles Internal Medicine*. Pp: 1076-1139. 16^a ed. The McGraw Hill Companies, Inc.

FELLAY, J.; BOUBAKER, B.; LEDERGERBER, B; BERNASCONI, E.; FURRER, H.; BATTEGAY, M.; HIRSCHL, B.; VERNAZZA, P.; FRANCIOLI, P.; GREUB, G.; FLEPP, M. y TELENTI, A. (2001): Prevalence of adverse events associated with potent antiretroviral treatment: Swiss HIV Cohort Study. *Lancet*. **358**: 1322-1327.

FINZI, D.; BLANKSON, J.; SICILIANO, J. D. ET ALL (1999): Latent infection of CD4⁺ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**: 512-517.

FONQUERNIE, L.; SERFATY, L.; CHARROIS, A.; WENDUM, D.; LEFEBVRE, B.; GIRARD, P. M. y MEYNARD, J. L. (2004): Significance of hepatitis C virus coinfection with persistently normal alanine aminotransferase levels in HIV-1 infected patients. *HIV Medicine*. **5**: 385-390.

FUNCEI (FUNDACIÓN CENTRO DE ESTUDIOS INFECTOLÓGICOS) (1999): Coinfección del HIV con virus de hepatitis B y C. Relación HIV - VHC. *Tratamiento Antiviral*, noviembre 1999.

FUNG, H. B. y GUO, Y. (2004): Enfuvirtide: a fusion inhibitor for the treatment of VIH infection. *Clin. Ther.*, **26**: 352-378.

FURLINI, G.; VIGNOLI, M.; RE, M. C.; GIBELLINI, D.; RAMAZZOTTI, E.; ZAULI, G. y LAPLACA, M. (1994): Human - immunodeficiency - virus type - 1 interaction whit

the membrane of CD4⁽⁺⁾ cells induces the synthesis and nuclear translocation of 70K heat – shock protein. *J. Gen. Virol.*, **75**: 193-199.

FÜST, G.; BECK, Z.; BÁNHEGYI, D.; KOCSIS, J.; BIRÓ, A. y PROHÁSZKA, Z. (2005): Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV infection. *Mol. Immunol.*, **42**: 79-85.

GARCÍA, F.; CLOTET, B.; MORENO, S.; LÓPEZ BERNALDO DE QUIRÓS, J. C. y GATELL, J. M. (2002): Interrupciones del tratamiento en la práctica clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **20**: 68-73.

GARCIA DE OLALLA, P.; KNOBEL, H.; CARMONA, A.; GUEJAR, A.; LÓPEZ-COLOMES, J. L. y CAYLA, J. A. (2002): Impact of adherence and highly active antiretroviral therapy on survival in HIV-infected patients. *JAIDS – J. Acq. Imm. Def.*, **30**: 105-110.

GRENE, E.; PINTO, L. A.; LANDAY, A. L.; KESSLER, H. A.; ANDERSON, S. A.; DOLAN, M. J. y SHEARER, G. M. (2001): Anti-CCR5 antibodies in sera of HIV-positive individuals. *Hum. Immunol.*, **62**: 143-145.

GURTLER, L. G.; HAUSER, P. H.; EBERLE, J.; VONBRUNN, A.; KNAPP, S.; ZEKENG, L.; TSAGUE, J. M. y KAPTUE, L. (1994): A new subtype of human-immunodeficiency-virus type-1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.*, **68**: 1581-1585.

HAMERS, F. (2003): HIV/AIDS Surveillance in Europe. Mid-year report 2003. N° **69**.

HAMERS, F. y DOWNS, A. M. (2004): The changing face of the HIV epidemic. *Lancet*, **364**: 83-94.

HARDIN, J. W. y HILBE, J. M. (2003): Generalized estimating equations. Pp: 222. Chapman & Hall/CRC.

HASHIGUCHI, N.; OGURA, H.; TANAKA, H.; KOH, T.; AOKI, M.; SHIOZAKI, T.; MATSUOKA, T.; SHIMAZU, T. y SUGIMOTO, H. (2001): Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients. *J. Trauma.*, **50**: 102-107.

HERRUZO CABRERA, R.; SÁNCHEZ DE RIVERA, J. M. y CASTILLA CATALÁN, J. (2001): Epidemiología y prevención del SIDA. In GÁLVEZ VARGAS, R. y cols.: *Piédrola Gil, Medicina Preventiva y Salud Pública*. Pp: 555-564. 10^a ed. Masson. Barcelona.

HOFFMANN, C. y KAMPS, S. (2003): HIVMedicine 2003. www.hivmedicine.com

HOGAN, C. M. y HAMMER S. M. (2001): Host determinants in HIVinfection and disease. *Ann. Intern. Med.*, **134**: 761-776.

HOOGS, R. S.; HEATH, K.; BANGSBERG, D.; YIP, B.; PRESS, N.; O´SHAUGHNESS, M. V. y MONTANER, J. S. (2002): Intermittent use of triple-combination therapy is predictive of mortality at baseline and after 1 year of follow-up. *AIDS.*, **16**: 1051-1058.

HOLMBERG, C. (2000): *Phosphorilation-mediated regulation of heat shock transcription factor 1*. Abo Akademi University. Abo, Finland.

HOLMES, E. C. (2000): On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol. Rev.*, **76**: 239-254.

HORUK, R. (2001): Chemokine receptors. *Cyto .G. Fr.*, **12**: 313-335.

HU, W.; WU, W.; JIM YEUNG, S. C.; FREEDMAN, R. S.; KAVANAGH, J. J. y VERSCHRAEGEN, C. F. (2002): Increased expression of heat shock protein 70 in adherent ovarian cancer and mesothelioma following treatment with manumycin, a farnesyl transferase inhibitor. *Anticancer Res.*, **22**: 665-672.

HUANG, Y. X.; PAXTON, W. A.; WOLINSKY, S. M.; NEUMANN, A. U.; ZHANG, L. Q.; HE, T.; KANG, S.; CERADINI, D.; JIN, Z. Q.; YAZDANBAKHSI, K.; KUNSTMAN, K.; ERICKSON, D.; DRAGON, E.; LANDAU, N. R.; PHAIR, J.; HO, D. D. y KOUP, R. A. (1996): The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Medic.* **2**: 1240-1243.

I.C.A.S.O. (2000): El desarrollo de vacunas para prevenir el VIH/SIDA. Internacional Council of AIDS Service Organizations. Toronto

IORDANSKIY, S.; ZHAO, Y. Q.; DIMARZIO, P.; AGOSTINI, I.; DUBROVSKY, L. y BUKRINSKY, M. (2004^a): Heat-shock protein 70 exerts opposing effects on Vpr-dependent and Vpr-independent HIV-1 replication in macrophages. *Blood*, **104**: 1867-1872.

IORDANSKIY, S.; ZHAO, Y. Q.; DUBROVSKY, L.; IORDANSKAYA, T.; CHEN, M. Z. LIANG, D. y BUKRINSKY, M. (2004^b): Heat-shock protein 70 protects cell cycle arrest and apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J. Virol.*, **78**: 9697-9704.

JAIN, R.G.; FURFINE, E. S.; PEDNEAULT, L.; WHITE, A. J. y LENHARD, J. M. (2001): Metabolic complications associated with antiretroviral therapy. *Antivir. Res.*, **51**: 151-177.

JINDAL, S. (1996): Heat shock proteins: applications in health and disease. *Trends Biotechnol.*, **14**: 17-20.

JIRECEK, S.; HOHLAGSCHWANDTNER, M.; TEMPFER, C.; KNOFLER, M.; HUSSLEIN, P. y ZEISLER, H. (2002): Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: A pilot-study. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **114**: 730-732.

JOLLY, C. y MORIMOTO, R. I. (2000): Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**: 1564-72.

KAUFMANN, G. R.; PERRIN, L.; PANTALEO, G. et al(2003): CD4 T lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch. Intern. Med.* **163**: 2187-2195.

KIANG, J. G. y TSOKOS, G. C. (1998): Heat shock protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacol. Ther.*, **80**:183-201.

KLEIN, M. R.; KEET, I. P.; D'AMARO, J.; BENDE, R. J.; HEKMAN, A.; MESMAN, B.; KOOT, M.; DE WAAL, L. P.; COUTINHO, R. A. y MIEDEMA, F. (1994): Association between HLA frequencies and pathogenic features of human immunodeficiency virus type 1 infection in seroconverters from the Amsterdam cohort of homosexual men. *J. Infect. Dis.* **169**: 1244-1249.

KOBAYASHI, K.; OHGITANI, E.; TANAKA, Y.; KITA, M. y IMANISHI, J. (1994): Herpes simplex virus-induced expression of 70 kDa heat shock protein (Hsp70) requires early protein synthesis but not viral DNA replication. *Microbiol. Immunol.* **38**: 321-325.

KOCSIS, J.; PROHÁZKA, Z.; BIRÓ, A.; FÜST, G. y BÁNHEGYI, D. (2003): Elevated levels of antibodies against 70 kDa heat shock proteins in the sera of patients with HIV infection. *J. Med. Virol.*, **71**: 480-482.

KUMAR, A.; ANGEL, J. B.; DAFTARIAN, M. P.; PARATO, K.; CAMERON, W. D.; FILION, L. y DIAZ-MITOMA, F. (1998): Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. *Clin. Exp. Immunol.* **114**: 78-86.

KUMAZAKI, T.; WADHWA, R.; KAUL, S.C. y MITSUI, Y. (1997): Expression of endothelin, fibronectin, and mortalin as aging and mortality markers. *Exp. Gerontol.*, **32**: 95-103.

LAGUARDIA, J. y MERCHÁN-HAMANN, E. (2003): Factores de riesgo para la enfermedad tuberculosa en los casos de SIDA notificados en Brasil, 1980 a 2000. *Rev. Esp. Salud Pública.*, **77**: 553-565.

LANGE, C. G. y LEDERMAN, M. M. (2003): Immune reconstitution with antiretroviral therapies in chronic HIV-1 infection. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **51**: 1-4.

LEDERMAN, S. y SUCIU-FOCA, N. (1999): Antigen presenting cells integrate opposing signals from CD4+ and CD8+ regulatory T lymphocytes to arbitrate the outcomes of immune responses. *Hum. Immunol.* **60**: 533-561.

LIM, M. C.; BROOKE, S. M. y SAPOLSKY, R. M. (2003): gp120 neurotoxicity fails to induce heat shock defenses, while the over expression of hsp70 protects against gp120. *Brain Res. Bull.*, **61**: 183-188.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. y PARKER, J. (1997): Macromoléculas y genética molecular. *In Brock Biología de los Microorganismos*. Pp: 178-225. 8ª ed. Prentice Hall Iberia. Madrid.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. y PARKER, J. (1997): Principales enfermedades microbianas. *In Brock Biología de los Microorganismos*. Pp: 929-986. 8ª ed. Prentice Hall Iberia. Madrid.

MEDRANO, L.; PÉREZ-ÁLVAREZ, M.; THOMSON, M. y NÁJERA, R (2002): Avances en el desarrollo de vacunas frente al SIDA (parte II). *Publicación Oficial de la Sociedad Española Interdisciplinar del SIDA*, **13**: 572-577.

MERAVIGLIA, P.; SCHIAVINI, M.; CASTAGNA, A.; VIGANO, P.; BINI, T.; LANDONIO, S.; DANISE, A.; MOIOLI, M. C.; ANGELI, E.; BONGIOVANNI, M.; HASSON, H.; DUCA, P. y CARGNEL, A. (2004): Lopinavir/ritonavir treatment in HIV antiretroviral-experienced patients: evaluation of risk factors for liver enzyme elevation. *HIV Medicine*. **5**: 334-343.

MIGUELES, S. A. y CONNORS, M. (2001): Frequency and function of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunol Lett*. **79**:141-50.

MOLINA, A.; CARPEAUX, R.; MARTIAL, J. A. y MULLER, M. (2002): A transformed fish cell line expressing a green fluorescent protein-luciferase fusion gene responding to cellular stress. *Tox. In Vitro*, **16**: 201-207.

MORIMOTO, R. I. (1998): Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Dev.*, **12**: 3788-3796.

MORIMOTO, R. I. (1999): Heat-shock response. *In* CREIGHTON, T. E.: *Encyclopedia of Molecular Biology*, Pp: 1088-1098. John Wiley and Sons, Inc. New York.

NATIONAL INSTITUTE FOR COMMUNICABLE DISEASE OF THE NATIONAL HEALTH LABORATORY SERVICE (1998): Natural resistance to HIV/AIDS. *AIDS SA*. Volumen 6, número 3.

NOLLEN, E. A. y MORIMOTO, R. I. (2002): A heat shock response: cellular and molecular responses to stress, misfolded proteins, and diseases associated with protein aggregation. In *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Pp: 1553-1563. John Wiley and Sons, Inc. New York.

NOLLEN, E. A. y MORIMOTO, R. I. (2002): Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing "heat shock" proteins. *J. Cell. Sci.* **115**: 2809-2816.

ÖDBERG-FERRAGUT, C.; ESPIGARES, M. y DIVE, D. (1991): Stress protein synthesis, a potential toxicity marker in *Escherichia coli*. *Ecotox. Environ. Safe.*, **21**: 275-282.

OESTERREICH, S.; WENG, C. N.; QIU, M.; HILSENBECK, S. G.; OSBORNE, C. K. y FUQUA, S. A. (1993): The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer. Res.* **53**: 4443-4438.

ONUSIDA (2004): Situación de la epidemia de SIDA: 2004. ONUSIDA, Ginebra.

PAESA, C. R.; GARCES, P. A.; CATALAN, A. P.; LAZCANO, I. H. y ERRASTI, J. M. A. (1998): Characteristics of chronic hepatitis C in HIV infected patients. *Rev. Clin. Esp.* **198**: 207-211.

PANAYI, G. S.; CORRIGALL, V. M. y HENDERSON, B. (2004): Stress cytokines: pivotal proteins in immune regulatory networks. *Curr. Opin. Immunol.*, **16**: 531-534.

PATON, N. I.; ABOULHAB, J. y KARIM, F. (2002): Hydroxychloroquine, hydroxycarbamide, and didanosine as economic treatment for HIV-1. *Lancet*. **359**:1667-1668.

PERELSON, A. S.; ESSUNGER, P.; CAO, Y.; VESANEN, M.; HURLEY, A.; SAKSELA, K.; MARKOWITZ, M. y HO, D. D. (1997): Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature*. **387**: 188-191.

POCKLEY, A. G. (2003): Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*. **362**: 469-476.

POCKLEY, A. G.; DE FAIRE, U.; KIESSLING, R.; LEMNE, C.; THULIN, T. y FROSTEGÅRD, J. (2002): Circulating heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J. Hypertens.*, **20**: 1815-1820.

POCKLEY, A. G.; GEORGIADES, A.; THULIN, T.; DE FAIRE, U. y FROSTEGÅRD, J. (2003): Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension*, **42**: 235-238.

POCKLEY, A.G.; SHEPHERD, J. y CORTON, J. M. (1998): Detection of heat shock protein 70 (HSP70) and anti-HSP70 antibodies in the serum of normal individuals. *Inmunol. Invest.*, **27**: 367-377.

PRADO, J. G.; WRIN, T.; BEAUCHAINE, J.; RUÍZ, L.; PETROPOULUS, C. J.; FROST, C. D.; CLOTET, B.; D'AGUILA, R. T. y MARTÍNEZ PICADO, J. (2002): Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity. *AIDS*., **16**: 1009-1017.

RAKONCZAY, Z. JR; TAKÁCS, T. BOROS, I. y LONOVICS, J. (2003): Heat shock proteins and the pancreas. *J. Cell. Physiol.*, **195**: 383-391.

RAMÍREZ, J. R.; ORTIZ, S.; VALENZUELA, M.; DURÁN, V.; CABELLO, G.; LOBATO, S.; BOTELLA, S. y BOTELLA, L. M. (2001): Expression and localization of Hsp70 y Hsp27 in human breast tumors. *Rev. Esp. Patol.*, **34(1)**: 9-17.

RASSOW, J.; VON AHSEN, O.; BÖMER, U. y PFANNER, N. (1997): Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Cell. Biol.*, **7**: 129-133.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; QUIJADA, L. y ALONSO, C. (1997): Antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas de choque térmico. *Ars Pharmaceutica.*, **38**: 191-208.

ROBERT, J. (2003): Evolution of shock protein and immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, **27**: 449-464.

RODES, B.; TORO, C.; PAXINOS, E.; POVEDA, E.; MARTINEZ-PADIAL, M.; BENITO, J. M.; JIMENEZ, V.; WRIN, T.; BASSANI, S. y SORIANO, V. (2004): Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS*, **18**: 1109-1116.

ROEDLING, S.; PEARL, D.; MANJI, H.; HANNA, M. G.; HOLTON, J. L. y MILLER, R. F. (2004): Unusual muscle disease in HIV infected patients. *Sex. Transm. Infect.* **80**: 315-317.

ROMAGNANI, S. (1997): The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today.*, **18**: 263-266.

SALVI, R.; GARBUGLIA, A. R.; DI CARO, A.; PULCIANI, S.; MONTELLA, F. y BENEDETTO, A. (1998): Grossly defective nef gene sequences in a human

immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J. Virol.*, **72**: 3646-3657.

SANTOMENNA, L. D. y COLBERG-POLEY, A. M. (1990): Induction of cellular hsp70 expression by human cytomegalovirus. *J. Virol.*, **64**: 2033-2040.

SCHROEDER, S.; LINDEMANN, C.; HOEFT, A.; PUTENSEN, C.; DECKER, D.; VON RUECKER, A. y STUBER, F. (1999): Impaired inducibility of heat shock protein 70 in peripheral blood lymphocytes of patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.*, **27**: 1080-1084.

SHARKEY, M. E.; TEO, I.; GREENOUGH, T.; SHAROVA, N.; LUZURIAGA, K.; SULLIVAN, J. L.; BUCY, R. P.; KOSTRIKIS, L. G.; HAASE, A.; VERYARD, C.; DAVARO, R. E.; CHEESEMAN, S. H.; DALY, J. S.; BOVA, C.; ELLISON, R. T.; MADY, B.; LAI, K. K.; MOYLE, G.; NELSON, M.; GAZZARD, B.; SHAUNAK, S. y STEVENSON, M. (2000): Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat. Med.*, **6**: 76-81.

SHARP, F. R.; MASSA, S. M. y SWANSON R. A. (1999): Heat-shock protein protection. *TINS*, **22**: 97-99.

SIMON, F.; MAUCLERE, P.; ROQUES, P.; LOUSSERT-AJAKA, I.; MULLER-TRUTWIN, M. C.; SARAGOSTI, S.; GEORGES-COURBOT, M. C.; BARRE-SINOSSI, F. y BRUN-VEZINET, F. (1998): Identification of a new immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* **4**: 1032- 1037.

SIMPSON, D. M.; KATZENSTEIN, D. A.; HUGHES, M. D.; HAMMER, S. M.; WILLIAMSON, D. L.; JIANG, Q. y PI, J. T. (1998): Neuromuscular function in HIV infection: analysis of a placebo-controlled combination antiretroviral trial. *AIDS.*, **12**: 2425-2432.

SOLANA, R.; CELADA, A. y PEÑA, J. (1994): Sistema Mayor de Histocompatibilidad. In PEÑA MARTÍNEZ, J.: *Inmunología: bases moleculares y celulares*. Pp: 154-180. Pirámide. Madrid.

STRATOV, I.; DEROSE, R.; PURCELL, D. F. J. y KENT, S. J. (2004): Vaccines and vaccine strategies against HIV. *Curr. Drug Targets*. **5**: 71-88.

STYLIANOU, E.; AUKRUST, P.; KVALE, D.; MULLER, F. y FROLAND, S. S. (1999): IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression - down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, **116**: 115-120.

SUCIU-FOCA, N.; MANAVALAN, J. S. y CORTESINI, R. (2003): Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl. Immunol.*, **11**: 235-244.

SUTHON, V.; ARCHAWIN, R.; CHANCHAI, C.; JOHN, L.; WICHUDA, K.; WIROJ, P.; HANSA, T.; PATHOM, S.; PONGNUWAT, S.; SILAPORN, P. y WIMALA, I. (2002): Impact of HIV vaccination on laboratory diagnosis: case reports. *BMC Infect. Dis.*, **2**: Art. No. 19, Sep 10.

TAFFÉ, P.; RICKENBACH, M.; HIRSCHL, B.; OPRAVIL, M.; FURRER, H.; JANIN, P.; BUGNON, F.; LEDERGERBER, B.; WAGELS, T. y SUDRE, P. (2002): Impact of occasional short interruptions of HAART on the progression of HIV infection: results from a cohort study. *AIDS*, **16**: 747-755.

UNAIDS: THE JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (2004): 4TH Report on the global AIDS epidemic. *UNAIDS*. (www.unaids.org/en/default.asp).

VLAD, G.; PIAZZA, F.; COLOVAL, A.; CORTESINI, R.; DELLA PIETRA, F.; SUCIU-FOCA, N. y MANAVALAN, J. S. (2003): Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Hum. Immunol.*, **64**: 483-489.

WAINBERG, Z.; OLIVEIRA, M.; LEMER, S.; TAO, Y. y BRENNER, B. G. (1997): Modulation of stress protein (hsp27 and hasp70) expression in CD4+ lymphocytic cells following acute infection with human immunodeficiency virus tipe-1. *Virology*, **233**: 364-373.

WALKERS, B. D. (2001): HIV phatogenesis and prospects for vaccine development. *Topics in HIV Medicine*. **9**:4-9.

WALLIN, R. P. A.; LUNDQVIST, A.; MORE, S. H.; VON BONIN, A.; KIESSLING, R. y LJUNGGREN, H. G. (2002): Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.*, **23**: 130-135.

VARGAS-ROIG, L. M. y CIOCCA, D. R. (2000): Resistencias a drogas en pacientes con cáncer de mama. *Ciencia al Día Internacional*, **3**: 1-6.

WELCH, W. J. (1993): How cells respond to stress. *Sci. Am.*, **Mayo**: 34-41.

WHEELER, D. S.; DUNSMORE, K.E. y WONG, H. R. (2002): Intracellular delivery of Hsp70 using HIV-1 Tat protein transduction domain. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **301**:54-59.

WONG, J. K.; GUNTARD, H. F.; HAVLIR, D. V.; ZHANG, Z. Q.; HAASE, A. T.; IGNACIO, C. C.; KWOK, S.; EMINI, E. y RICHMAN, D. D. (1997): Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 12574-12579.

WRIGHT, B.H.; CORTON, J.M.; MEGUID EL-NAHAS; WOOD, R. F. M. y POCKLEY, A. G. (2000): Elevated levels of circulating heat shock protein 70 (Hsp70) in peripheral and renal vascular disease. *Heart Vessels*, **15**: 18-22.