

## Elevación de las proteínas de estrés de 70 kDa (Hsp70) en pacientes infectados por VIH

Elena ESPIGARES RODRÍGUEZ,<sup>a</sup> Aurora BUENO CAVANILLAS,<sup>a</sup> José HERNÁNDEZ QUERO,<sup>b</sup> Juan de Dios LUNA DEL CASTILLO<sup>c</sup> y Miguel ESPIGARES GARCÍA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. Correo-e: mespigar@ugr.es

<sup>b</sup> Servicio de Medicina Interna. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínico Universitario San Cecilio. Universidad de Granada. Avda del Dr. Olóriz, 16. 18012 Granada.

<sup>c</sup> Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Universidad de Granada. Facultad de Medicina. Avda Madrid, 11. 18012 Granada.

---

### RESUMEN

*Fundamento y objetivo:* Se ha observado un incremento en los niveles de proteínas de estrés de 70 kDa (Hsp70) en pacientes VIH positivos, aunque no se conoce la importancia de este hecho para el diagnóstico y pronóstico de la infección, y tampoco la relación entre este incremento de Hsp70 con los niveles de otros parámetros bioquímicos. El objetivo del presente estudio ha sido explorar la relación entre la concentración de Hsp70 y la carga viral, linfocitos CD4<sup>+</sup>, y algunos parámetros bioquímicos.

*Material y método:* Se ha realizado un estudio transversal con 174 muestras de suero de pacientes diagnosticados de infección por VIH y 20 muestras de controles sanos. La concentración de Hsp70 se ha determinado por inmunoensayo (ELISA). Se han recogido las variables más importantes relacionadas con la infección, como son la carga viral, linfocitos CD4<sup>+</sup>, creatinina, GPT (transaminasa glutámico-pirúvica), CPK (creatinin-fosfoquinasa) y colesterol total.

*Resultados:* La concentración de Hsp70 obtenida en el momento del fracaso virológico fue aproximadamente 10 veces más alta que en aquellos sueros en situación de estabilidad viroinmunológica. Se ha observado una relación estadísticamente significativa entre Hsp70 y el recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CPK y GPT. Además, se han obtenido valores significativamente más elevados para la variable transformada Hsp70/CD4<sup>+</sup> en situación de fracaso virológico.

*Conclusiones:* Los valores elevados de Hsp70 y Hsp70/CD4<sup>+</sup> en situación de fracaso virológico, y la asociación entre los niveles de Hsp70, GPT y CPK, indican que los niveles de Hsp70 podrían ser útiles para determinar el estado y evolución de pacientes VIH+.

*Palabras clave:* Hsp70, SIDA, VIH, fracaso virológico, linfocitos CD4.

---

### INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que la población sana muestra unos niveles basales de Hsp70<sup>1</sup>, aunque se ha observado que en enfermos existe una sobreexpresión de estas proteínas de estrés si los comparamos con individuos sanos<sup>2</sup>. La respuesta al estrés, especialmente

la de Hsp70, juega un papel importante en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). A pesar de que los viriones VIH -1 contienen Hsp, el estudio de estas proteínas ha recibido una limitada atención.

Hsp70 es una proteína que confiere citoprotección frente a una variedad de estresores celulares, por

lo que éstos inducen un aumento de los niveles intracelulares de Hsp70. Un estudio reciente muestra que las proteínas Hsp70 de origen microbiano ejercen una inhibición dosis – dependiente de VIH-1 en el interior de las células CD4<sup>+</sup> humanas; el mecanismo de inhibición de la infectividad de VIH-1 por Hsp70 puede bloquear directa e indirectamente los co-receptores CCR5 por inducción de citocinas CC y APOBEC3G<sup>3</sup>. Algunas evidencias indican que un aumento de la expresión de Hsp70 podría representar una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de pacientes críticos<sup>4</sup>.

Varios estudios se han centrado en la repercusión de las proteínas de estrés en la interacción huésped-virus en infecciones por virus RNA. Estos estudios demuestran algunos hechos de importancia, tales como que las proteínas Hsp son necesarias para que se realicen algunos pasos del ciclo de replicación viral; que la incorporación de Hsp en el virus determina su infectividad; y que la presencia de estas proteínas en la superficie celular provoca una inmunidad frente al virus<sup>5</sup>.

A pesar de lo anteriormente expuesto, el papel de Hsp70 en VIH/SIDA no se conoce muy bien. El VIH se multiplica dentro de los linfocitos CD4<sup>+</sup> hasta causar la destrucción celular, y cuando el recuento éstos cae por debajo de 200 células/ $\mu$ l, existe una alta susceptibilidad a patógenos oportunistas y otras enfermedades. El SIDA es la consecuencia de esta situación clínica. Aunque la terapia antirretroviral altamente activa se usa para mantener el número de copias virales bajo o indetectable, cuando se producen resistencias o se interrumpe la terapia, aparece un fracaso virológico<sup>6,7</sup>.

Algunos estudios han comparado la expresión de Hsp70 en linfocitos de pacientes VIH<sup>+</sup> con la de controles, mostrando que la capacidad de producción de Hsp70 es más grande en pacientes<sup>8</sup>. En células linfocíticas infectadas con VIH, Wainberg et al. (1997)<sup>9</sup> muestran que los niveles de Hsp70 permanecen constantes durante la infección aguda, aunque a las 24 horas después de la infección se observan nuevas isoformas que desaparecen a las 48 horas, demostrando que las Hsp70 están envueltas en diferentes pasos del ciclo de replicación viral; también se observa un incremento de la respuesta inmune humoral específica frente a Hsp70. Kocsis et al. (2003)<sup>10</sup> demostraron que los niveles de anticuerpos anti-Hsp70 fueron dos veces más altos en pacientes infectados por el VIH que en controles sanos, y las concentraciones de anticuerpos en suero disminuyeron a pesar de la aplicación de la terapia antirretroviral altamente activa. En un estudio más reciente se demuestra que la concentración media de proteínas Hsp70 detectada en pacientes VIH+ fue el doble que en los controles, mientras que los pacientes viroinmunológicamente estables presentaban unos valores medios muy similares a los controles sanos<sup>11</sup>.

Con objeto de profundizar en el tema, el presente estudio trata de explorar la expresión elevada de

Hsp70 en sueros de pacientes VIH<sup>+</sup>. Para alcanzar este objetivo se cuantificó la concentración de Hsp70 en relación con la carga viral, linfocitos CD4<sup>+</sup> y parámetros bioquímicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Muestras*

En total, fueron incluidos en el estudio 174 sueros obtenidos de pacientes diagnosticados de infección por VIH procedentes de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, del Hospital San Cecilio en Granada. También fueron incluidos 20 sueros de controles sanos, para obtener un punto de referencia sobre los valores de Hsp70.

### *Concentraciones de Hsp70*

Para la detección de Hsp70 el método utilizado ha sido ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay)<sup>12-14,1</sup>, que a continuación se describe brevemente. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubrían de anticuerpos monoclonales específicos para Hsp70 humana (SPA-810, StressGen Bioreagents Corporation, Ann Arbor, MI, USA). La placa se lava y bloquea con 1 % de albúmina de suero bovino (A-4503, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y se añade las muestras y la proteína Hsp70 recombinante humana (NSP-555, StressGen Bioreagents Corporation, Ann Arbor, MI, USA). La Hsp70 se determina usando un anticuerpo policlonal anti-Hsp70 de conejo (SPA-812, StressGen Bioreagents Corporation, Ann Arbor, MI, USA) y una anti-IgG de conejo conjugada con fosfatasa alcalina (clone Rg-96, A-2556, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para el revelado se usa un sustrato cromógeno de *p*-nitrofenil fosfato (N-2770, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se miden la absorbancia a 405 y 630 nm y las concentraciones de Hsp70 se determinan mediante la recta de regresión obtenida con las variables absorbancia y concentraciones de la curva patrón.

### *Variables relacionadas con la infección por VIH*

Se han determinado las siguientes variables: carga viral, recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup>, creatinina, transaminasa glutámico-pirúvica (GPT, también conocida como alanina aminotransferasa o ALT), creatinin-fosfoquinasa (CPK), y colesterol total.

En relación a la carga viral, se definieron 2 situaciones clínicas: a) estabilidad viroinmunológica (EVI), cuando presentan una carga viral indetectable (<50 copias/ml); y b) fracaso virológico (FV), en el momento en que la carga viral excede las 5000 copias/ml.

La situación de estabilidad viroinmunológica se ha dividido en 3 subgrupos en función del recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup>: nivel de inmunidad bajo (<200 linfocitos CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l), medio (200-500 linfocitos CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l), y alto (>500 linfocitos CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l).

**Análisis**

El análisis estadístico de los datos se ha dividido en dos partes. Para cada una de las variables del estudio se ha realizado un estudio descriptivo (media, desviación típica, rango, etc.). Debido al diferente número de sueros procedentes de pacientes y de controles, y considerando que las muestras no eran independientes, se ha empleado la metodología de modelos GEE (Generalized Estimating Equations)<sup>15</sup>. Esta metodología, formalmente parecida a los modelos de regresión lineal múltiple, ha permitido obtener la significación estadística de las asociaciones entre cada variable y los niveles de Hsp70.

**TABLA 1. Valores medios de Hsp70 (ng/mL) en situación de fracaso virológico (FV), estabilidad viroinmunológica (EVI) y controles.**

Variable	FV	EVI	Controles
	Media ± DE (min-max)	Media ± DE (min-max)	Media ± DE (min-max)
Hsp70 (ng/ml)	703,49 ± 3055,09 (0 - 14032,14)	70,44 ± 144,26 (0 - 905,78)	72,06 ± 97,21 (0 - 343)

DE: desviación estándar. Diferencias no significativas:  $p > 0,1$ .

En todos los casos en que ha sido necesario, se han transformado los valores de Hsp70 para conseguir que las varianzas sean homogéneas, empleando el logaritmo neperiano de la medida más uno como la transformación más común, puesto que así se conseguía estabilizar las varianzas. Como los niveles de Hsp70 podrían ser dependientes del número de

linfocitos CD4<sup>+</sup> circulantes, se ha incluido la variable transformada Hsp70/CD4<sup>+</sup>.

El programa que se ha empleado en todos los análisis ha sido STATA 8.1, dentro del comando *xtgee*. Se ha empleado el nivel 0,05 para declarar, en un primer nivel, el resultado como significativo.

**RESULTADOS**

Se ha estudiado un total de 174 sueros de pacientes VIH+, estratificados en dos grupos: situación de FV (21 de ellos) y EVI, en función de la carga viral en el momento de la extracción de la sangre. Al comparar la situación de FV con la de EVI y controles, se ha observado que los valores de Hsp70 son 10 veces superiores en la situación de fracaso virológico; a pesar de ello las diferencias no llegaron a ser significativas (tabla 1). Por el contrario, los valores medios de Hsp70 en situación de EVI son muy similares a los obtenidos en los controles sanos.

Se han encontrado diferencias casi significativas en los valores de GPT (para varianzas desiguales  $t_{exp} = 1,5175$ ;  $p < 0,1$ ), y diferencias estadísticamente significativas en los valores de CD4<sup>+</sup> (para varianzas desiguales  $t_{exp} = -2,4576$ ;  $p < 0,01$ ). Para el resto de las variables no se han observado diferencias significativas entre los dos grupos (tabla 2).

Además, se ha analizado la relación entre los valores de Hsp70 y los parámetros analíticos mediante regresión lineal, tomando el valor del logaritmo neperiano para las variables concentración de Hsp70 y la carga viral. Se ha alcanzado una significación estadística para la correlación entre los valores logarítmicos y la concentración de las enzimas hepáticas CPK y GPT, siendo casi significativa la correlación con el colesterol total (tabla 3).

Debido a que los niveles de Hsp70 podrían ser dependientes de la concentración de linfocitos CD4<sup>+</sup>, se ha explorado una posible asociación entre la razón Hsp70/CD4<sup>+</sup> y el resto de variables. La tabla 4 proporciona los valores

**TABLA 2. Estudio descriptivo de las variables analíticas de los sueros.**

Variable	FV Media ± DE (min-max)	EVI Media ± DE (min-max)
Carga viral (copias/ml)	74640,48 ± 160561,90 (6100 - 680000)	38,10 ± 20,45 (0 - 90)
Creatinina (mg/dl)	1,09 ± 0,19 (0,7 - 1,63)	1,05 ± 0,19 (0,63 - 1,8)
GPT (mU/ml) *	98,24 ± 121,60 (9 - 467)	57,22 ± 63,25 (9 - 450)
CPK (U/ml)	107,25 ± 84,45 (26 - 382)	127,80 ± 123,37 (10 - 986)
Colesterol total (mg/dl)	186,05 ± 48,12 (113 - 317)	212,84 ± 70,61 (36 - 813)
Linfocitos CD4 <sup>+</sup> (células/μl)**	391,67 ± 232,70 (76 - 941)	532,27 ± 323,89 (13 - 1513)
Linfocitos CD8 <sup>+</sup> (células/μl)	1085,19 ± 556,16 (282 - 2381)	924,27 ± 418,62 (249 - 2237)

DE: desviación estándar. \* Diferencias casi significativas ( $p < 0,1$ ). \*\* Diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

**TABLA 3. Relación entre el logaritmo neperiano de Hsp70 y cada una de las diferentes variables de estudio.**

Variable	Nivel de significación	Coefficiente de correlación
Carga viral (Ln)	$p = 0,702$	$r = -0,032$
Creatinina	$p = 0,103$	$r = -0,181$
CPK	$p = 0,0005$	$r = -0,378$
GPT	$p = 0,003$	$r = -0,181$
Colesterol total	$p = 0,094$	$r = -0,220$
Linfocitos CD4 <sup>+</sup>	$p = 0,431$	$r = 0,104$

del cociente Hsp70/CD4<sup>+</sup> estratificados según la situación viroinmunológica, excluyendo los valores cero. Los resultados muestran que la variable Hsp70/CD4<sup>+</sup> es más alta cuanto peor es la situación viroinmunológica. En el situación de EVI (>500 linfocitos CD4<sup>+</sup>/μl), se ha obtenido un valor medio de 0,19, frente a 1,19 en situación de FV siendo las diferencias estadísticamente significativas. Dentro del grupo de sueros obtenidos en situación EVI, los

**TABLA 4. Valores del cociente Hsp70/CD4<sup>+</sup> en los sueros estratificados según la situación inmunológica.**

Situación viroinmunológica	N	Media	DE
FV	32	1,19	4,19
EVI <200 CD4 <sup>+</sup> /μl	3	0,80	0,47
EVI 200-500 CD4 <sup>+</sup> /μl	10	0,53	0,49
EVI >500 CD4 <sup>+</sup> /μl	29	0,19	0,21

DE: Desviación estándar. Diferencias significativas

valores medios Hsp70/CD4<sup>+</sup> son más altos en el peor estado (<200 linfocitos CD4<sup>+</sup>/μl) (Tabla 4).

Aunque los resultados no se muestran, no se han encontrado asociaciones significativas entre el cociente Hsp70/CD4<sup>+</sup> y valores de creatinina, colesterol total, o enzimas hepáticas GPT y CPK, o niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup>.

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran que durante la replicación viral en la infección por VIH se produce un incremento de la síntesis de Hsp70, que se puede detectar mediante el aumento de los niveles séricos. De hecho, en el momento de FV los valores de Hsp70 son diez veces superiores a los obtenidos en los sueros correspondientes a momentos de EVI. El valor medio de los sueros correspondientes al momento de FV fue de 703,5 ng/ml, frente a 70,4 ng/ml para los de EVI. A pesar de ello las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, ni en el análisis de los valores absolutos ni cuando las comparaciones se

realizaron utilizando las transformaciones logarítmicas, debido a la gran variabilidad de los valores obtenidos. Esta gran variabilidad en los niveles de Hsp70 se ha observado en otros estudios realizados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (media: 239,4 ng/ml; desviación estándar: 367,9 ng/ml)<sup>12</sup>, en mujeres y hombres sanos (0–13380 y 0–18550 ng/ml respectivamente)<sup>1</sup>, y en mujeres embarazadas con preeclampsia (media: 2,82 ng/ml; desviación estándar: 8,33 ng/ml)<sup>16</sup>. Los datos publicados previamente indican una media de la concentración de Hsp70 de 145,4 ng/ml en pacientes infectados VIH frente a 72,1 ng/ml en sujetos no infectados<sup>11</sup>. En el mismo estudio se obtuvo una media de los niveles de Hsp70 de 249,1 ng/ml para pacientes durante el FV, cuatro veces más alto que los niveles de pacientes con EVI, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No obstante, a pesar de no obtenerse esta significación estadística, debido fundamentalmente a la variación interindividual, sí que existe la evidencia biológica de que se produce un notable aumento de Hsp70 como respuesta frente a la replicación viral durante el FV. Un aumento en los niveles de Hsp70 es uno de los mecanismos de defensa celular durante la replicación viral, lo que ha sido demostrado en estudios previos, en los que las proteínas Hsp70 ejercen un efecto inhibitorio en la replicación de VIH-1, de manera que altos niveles de Hsp70 podrían proteger a las células del efecto citotóxico del virus VIH-1 y reducir la replicación viral<sup>17</sup>.

El fracaso virológico está acompañado por un aumento en la carga viral y una disminución del recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup>, pero del resto de variables analizadas sólo se produce un incremento casi significativo ( $p < 0,1$ ) en los valores de GPT (Tabla 2). Es interesante observar que los valores medios del recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup> no son lo suficientemente bajos para indicar el fracaso virológico, a pesar de que las diferencias fueron estadísticamente significativas. El valor medio del recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup> durante el FV fue de 391.7 células/μl, y de 532.3 células/μl en la situación de EVI (Tabla 2). Estos valores parecen indicar que el recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup> no es un buen indicador del fracaso virológico.

Se exploró la existencia de correlación entre los niveles de Hsp70, cuantificados como logaritmo neperiano mas uno, y los parámetros analíticos (Tabla 3). No se ha observado una correlación significativa entre los niveles de Hsp70 en suero y aquellas variables relacionadas con la infección por VIH, tales como la carga viral o el recuento de linfocitos CD4<sup>+</sup>; se ha detectado la existencia de correlación estadísticamente significativa con los niveles de GPT y CPK, y casi significativa con el colesterol total. En los tres casos la correlación es negativa, lo que indica que cuanto menor es valor de estos parámetros mayor es el valor del logaritmo neperiano de la proteína Hsp70. La alteración de estos parámetros se considera de etiología multifactorial, y entre los fac-

tores asociados se incluye el tratamiento antirretroviral<sup>18,19</sup>. Con respecto al colesterol total, nuestros resultados coinciden con lo observado anteriormente, que la hipocolesterolemia es significativamente más prevalente en los individuos VIH+ que en los seronegativos, es decir, que la infección por VIH se acompaña de un descenso del colesterol total<sup>20</sup>.

Aun cuando los datos no son absolutamente concluyentes, la observación de los resultados 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 sólo 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.

Dado que la infección viral reduce el número de linfocitos CD4<sup>+</sup>, y que éstos son los principales responsables de la síntesis de Hsp70 en este proceso infeccioso viral, los niveles de esta proteína podrían estar condicionados por el número de linfocitos CD4<sup>+</sup>, por lo que resulta razonables explorar la utilidad de la variable transformada Hsp70/CD4<sup>+</sup>. Para ello se ha obtenido el cociente Hsp70/CD4<sup>+</sup> para cada una de las muestras del estudio, y se ha analizado su relación con la situación virológica del paciente. Como se indica en los datos de la tabla 4, cuanto peor era la situación clínica del paciente, mayor era el valor de esta variable transformada, con un valor medio de 1,19 en situación de FV, descendiendo al mejorar la situación viroinmunológica, siendo de 0,19 en situación de EVI >500 CD4<sup>+</sup>/µl, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). Esto muestra que la variable Hsp70/CD4<sup>+</sup> puede ser un indicador útil para el diagnóstico de la situación clínica de pacientes VIH<sup>+</sup>.

En conclusión, existe una asociación entre la situación viroinmunológica de pacientes VIH<sup>+</sup> y los niveles de Hsp70 en suero, con valores elevados en la situación de fracaso virológico. Los valores de Hsp70 muestran una correlación estadística con las enzimas CPK y GPT, determinadas en el seguimiento de los pacientes VIH<sup>+</sup>. Finalmente, la variable transformada Hsp70/CD4<sup>+</sup> puede ser útil como un indicador de la situación clínica y evolución de estos pacientes.

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Pockley y su grupo de trabajo (Immunobiology Research Group, Division of Clinical Sciences Northern General Hospital, Medical School, University of Sheffield, U. K.), por la gran ayuda prestada para que este estudio fuese posible, así como la supervisión de este artículo; y a César Criado por la ayuda técnica prestada.

Este estudio ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (proyecto FIS 02/0050), y los fondos FEDER (UE).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (HSP70) and anti-HSP70 antibodies in the serum of normal individuals. *Inmunol Invest* 1998; 27:367-377.
2. Boshoff T, Lombard F, Eiselen JJ, Bornman JJ, Bachelet M, Polla BS, Bornman L. Differential basal synthesis of Hsp70/Hsc70 contributes to interindividual variation in Hsp70/Hsc70 inducibility. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:1317-1325.
3. Babaahmady K, Oehlmann W, Singh M, Lehner T. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4<sup>+</sup> T cells by microbial HSP70 and the peptide epitope 407-426. *J Virol* 2007; 81:3354-3360.
4. Wheeler DS, Dunsmore KE, Wong HR. Intracellular delivery of Hsp70 using HIV-1 Tat protein transduction domain. *Biochem Res Commun* 2003; 301:54-59.
5. Brenner BG, Wainberg MA. Heat shock protein-based therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type I infection. *Inf Dis Obst Gyn* 1999; 7:80-90.
6. Bon I, Gibellini D, Borderi M, Alessandrini F, Vitone F, Schiavone P, Re MC. Genotypic resistance in plasma and peripheral blood lymphocytes in a group of naive HIV-1 patients. *J Clin Virol* 2007; 38:313-320.
7. Vergani B, Lo Cicero M, Viganò O, Sirianni F, Ferramosca S, Vitiello P, Di Vincenzo P, De Pascuale MP, Galli M, Rusconi S. Evolution of the HIV-1 protease region in heavily pretreated HIV-1 infected patients receiving Atazanavir. *J Clin Virol* 2008; 41:154-159.
8. Agnew LL, Kelly M, Howard J, Jeganathan S, Batterham M, French RA, Gold J, Watson K. Altered lymphocyte heat shock protein 70 expression in patients with HIV disease. *AIDS* 2003; 17:1985-1988.
9. Wainberg Z, Oliveira M, Lemer S, Tao Y, Brenner BG. Modulation of stress protein (Hsp27 and Hsp70) expression in CD4<sup>+</sup> lymphocytic cells following acute infection with human immunodeficiency virus type-1. *Virology* 1997; 233:364-373.
10. Kocsis J, Prohazka Z, Biró A, Füst G y Bánhegyi. Elevated levels of antibodies against 70 kDa heat shock proteins in the sera of patients with HIV infection. *J. Med. Virol.* 2003, 71:480-482.
11. Espigares E, Bueno A, Hernández J, García F, Luna JD, Espigares M, Gálvez R. Levels of Hsp70 in HIV+ patients in different viroimmunological states. *J Med Virol* 2006;78:318-323.
12. Cederholm A, Svenungsson E, Stengel D, Fei GZ, Pockley AG, Ninio E, Frostegard J. Platelet activating factor acetylhydrolase and other novel risk and protective factors for cardiovascular

- disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2869-2876.
13. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegård J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 2003; 42:235-238.
  14. Pockley AG, de Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J. Circulating heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens* 2002; 20:1815-1820.
  15. Hardin JW, Hilbe JM. Generalized estimating equations. Chapman & Hall/CRC, London, 2003.
  16. Jirecek S, Hohlagschwandtner M, Tempfer C, Knöfler M, Husslein P, Zeisler H. Serum levels of heat shock protein 70 in patients with preeclampsia: A pilot-study. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114:730-732.
  17. Iordanskiy S, Zhao Y, Dubrovsky L, Iordanskaya T, Chen M, Liang D, Bukrinsky M. Heat shock protein 70 protects cells from cell cycle arrest and apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol* 2004; 78:9697-9704.
  18. Jain RG, Furfine ES, Pedneault L, White AJ, Lenhard JM. Metabolic complications associated with antiretroviral therapy. *Antivir Res* 2001; 51: 151-177.
  19. Fellay J, Boubaker K, Ledergerber B, Bernasconi E, Furrer H, Battegay M, Hirschel B, Vernazza P, Francioli P, Greub G, Flepp M, Talenti A. Prevalence of adverse events associated with potent antiretroviral treatment: Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2001; 358:1322-1327.
  20. Muga R, Tor J, Rey-Joly C, Pardo A, Llobet P y Foz M. Dislipemia e infección por VIH-1 en adictos a drogas intravenosas. *Med Clin (Barc)* 1993; 100:161-163.