

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Medicina**



**PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EN ESTRÉS  
QUIRÚRGICO Y ANESTÉSICO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Rafael Ramos Fernández**

Bajo la dirección de los doctores

María de la Concepción Guisasola Zulueta  
José Luis Álvarez-Sala Walter

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-2686-9**

**© Rafael Ramos Fernández, 2008**







4.6.2. Western blot.	
4.6.3. Análisis cuantitativo de bandas inmunoblot.	
4.7. Anticuerpos anti-hsp70s.	63
4.8. Interleuquina 6	63
4.9. Análisis estadístico.	63
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>65</b>
5.1. Características de la muestra.	65
5.2. HSPs.	70
5.3. Anticuerpos anti-HSPs70.	78
5.4. Interleuquina 6 (IL-6).	81
5.5. Correlaciones.	85
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>86</b>
6.1. Características de la muestra.	86
6.2. HSPs.	88
6.3. Anticuerpos anti HSPs.	93
6.4. Interleucina 6.	95
6.5. Perspectivas de futuro.	96
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>102</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

### A

- A.A.S: ácido acetil salicílico
- AC: anticuerpo.
- ACTH: hormona adrenocorticotrópica.
- ACVA: accidente cerebro vascular agudo.
- AINE: antiinflamatorio no esteroideo.
- APCs: células presentadoras de antígenos.
- ASA: escala de la sociedad americana de anestesiología.
- AST: aspartato amino transferasa.
- ATP: adenosín tri fosfato.

### B

- BSA: albúmina sérica bovina.

### C

- CD: Cluster of differentiation
- CH: concentrado de hematíes.
- C.I: cardiopatía isquémica
- COT: cirugía ortopédica y traumatología.
- CRH: Hormona liberadora de corticotropina.
- CSF: factores estimulantes de colonias.

### D

- DMID: diabetes mellitus insulindependiente.
- DMNID: diabetes mellitus no insulindependiente.
- DNA: ácido desoxinucleico.
- DT: desviación típica.

### E

- EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

### G

- Genes *hsp70*: genes de proteínas de choque térmico 70.
- GF: factores de crecimiento.
- Grp: proteínas reguladas por la glucosa.

### H

- HDA: hemorragia digestiva alta.
- HLA: antígeno de leucocitos humanos.
- HS: choque térmico.
- HSEs: elementos de choque térmico.
- HSFs: factores de choque térmico.
- HSPs: proteínas de choque térmico.
- HSPi: proteínas de choque térmico inducibles
- HSPc: proteínas de choque térmico constitutivas
- *hsp*s: genes de choque térmico.
- HTA: hipertensión arterial.

### I

- IAM: infarto agudo de miocardio.
- IL: interleuquina.

- iNOX: sintetasa del óxido nítrico.
- kDa: kilodaltons

## L

- LDH: lactato deshidrogenasa.
- LDL: lipoproteína de baja densidad.
- LSD: lóbulo superior derecho.
- LSI: lóbulo superior izquierdo.

## M

- mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

## N

- NADPH: Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
- NO: óxido nítrico

## P

- pag: página.
- PMNs: leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.
- PMSF: Phenylmethylsulfonyl Fluoride
- psm: peso molecular.

## Q

## R

- RIPA: radioinmunoprecipitation assay. Tampón de ruptura celular.
- RMN: resonancia magnética nuclear.
- RTU: resección transuretral
- Rx: radiografía.

## S

- SDS: sodium dodecyl sulfate
- SI: sistema internacional.
- SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
- SOD: superóxido dismutasa.
- SP: grupo de proteínas de estrés.
- SPHA: Sistema hipotálamo hipofisario adrenal.
- SSAM: Sistema simpático adrenal medular.

## T

- TAD: tensión arterial diastólica.
- TAS: tensión arterial sistólica.
- TEP: tromboembolismo pulmonar.
- TGF: factor transformador del crecimiento.
- TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.
- TNF-sr: receptor soluble del factor de necrosis tumoral
- TSH: tirotropina u hormona estimulante del tiroides.

## U

- UV: ultravioleta

## V

- VSG: velocidad de sedimentación globular.

## 1. Sumario

Todos los organismos están expuestos de forma continua a agentes estresantes. Estas agresiones generan respuestas celulares. Entre estas se encuentra la respuesta de choque térmico (Heat Shock Response HSR), que incluye la síntesis de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins HSPs), encargadas del plegamiento asistido de otras proteínas, tanto las recién sintetizadas como las que se dañan a causa de las agresiones externas. En el caso de que las proteínas dañadas no sean recuperables también se ocupan de regular su eliminación.

Existe una respuesta inmunológica frente a las HSPs propias que puede considerarse fisiológica y que incluye la existencia de anticuerpos frente a algunas de ellas. Se han formulado varias teorías para explicar este fenómeno. Según la teoría la “señal de peligro” elaborada por Matzinger el sistema inmune puede activarse en respuesta a sustancias endógenas liberadas a partir de tejidos dañados o sometidos a estrés, como las HSPs que son captadas células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells APCs*) y reconocidas por los linfocitos T; los linfocitos de tipo  $\gamma\delta$  son especialmente afines por las HSPs.

La agresión quirúrgica y anestésica supone un estrés importante para el organismo. La respuesta de estrés está bien documentada a nivel neuroinmunoendocrino, sin embargo apenas existen estudios que aclaren la fisiopatología de la respuesta de estrés celular en la agresión quirúrgica y anestésica.



Para estudiar la fisiología de la HSR durante ambos tipos de agresión se seleccionaron 21 pacientes a los que se les realizaron dos tipos de cirugía de intensidad diferente. 11 de ellos fueron sometidos a una toracotomía y 10 a una herniorrafia. Además se incluyeron 6 controles sanos de características sociodemográficas similares a los 21 casos.

Se extrajeron muestras de sangre periférica antes de la cirugía y 24 horas después. Se analizaron niveles de HSPs70 (tanto inducible como constitutiva), anticuerpos anti HSP70i e IL-6 mediante radio-inmuno-análisis (RIA).

El análisis de los resultados mostró un descenso global en los niveles de HSPs ( $p=0,091$ ) y de anticuerpos antiHSPs ( $p<0,05$ ), especialmente en el grupo de pacientes toracotomizados, así como un aumento muy marcado de IL-6 en el postoperatorio ( $p<0,05$ ). En algunos pacientes el descenso fue especialmente relevante: estos enfermos tenían antecedentes personales de patologías inflamatorias sistémicas o locales, así como una cierta tendencia a presentar complicaciones en el postoperatorio.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Generalidades

Los seres vivos se encuentran continuamente amenazados por agresiones externas que causan situaciones de estrés agudo o crónico. Los agentes estresantes pueden ser físicos (radiaciones, temperatura), químicos (fármacos, alimentos) o biológicos (infecciones bacterianas, virales), y la reacción de defensa genera respuestas a tres niveles diferentes pero interrelacionados: respuesta celular, respuesta inflamatoria local y respuesta inflamatoria sistémica.

Uno de los primeros agentes agresores estudiados fue la hipertermia<sup>1</sup>. Todas las células, tanto eucariotas como procariotas<sup>2</sup>, reaccionan frente a la hipertermia o ante cualquier otro estímulo que suponga un estrés para la célula con la denominada respuesta de choque térmico (*Heat Shock Response*; HSR), que se traduce en la activación de genes que codifican un grupo de proteínas activadas por estrés (*Stress Proteins*; SPs). Las proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs), constituyen el grupo de SPs más estudiadas. El nivel de expresión de HSPs es directamente proporcional a la intensidad del estímulo inductor de la HSR.

Las HSPs desempeñan un importante papel no sólo en los procesos de citoprotección frente a los efectos lesivos de distintos elementos estresantes, sino también en la reparación celular y tisular.

El cáncer, la isquemia-reperfusión, los procesos febriles o la infección inducen un incremento en la síntesis de las HSPs<sup>3</sup>. Las HSPs también están involucradas en los procesos de protección frente al estrés oxidativo originado

por causas como la radiación UV, citoquinas proinflamatorias [Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*Tumoral necrosis factor  $\alpha$* ; TNF $\alpha$ ), Interleuquina-1 (IL-1) o interleuquina-6 (IL-6)], o situaciones que supongan un déficit en los sistemas antioxidantes. Así, en los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), durante los procesos inflamatorios en los que se induce la masiva producción de especies reactivas de oxígeno en los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), se produce el incremento en la síntesis de HSPs<sup>4</sup>, a través de la activación de la Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato (NADPH).

Los agentes estresantes capaces de inducir la HSR, pueden clasificarse en tres grandes grupos<sup>5</sup>:

- medioambientales (hipertermia, análogos de aminoácidos, metales de transición, inhibidores del metabolismo energético o quimioterápicos),
- fisiopatológicos (fiebre, inflamación, estrés oxidativo, isquemia, cáncer, infección o daño neuronal)
- fisiológicos (ciclo celular, factores de crecimiento, desarrollo y diferenciación celular).

El estrés es un elemento habitual en la fisiología celular, participando en su funcionalidad. Esto implica una síntesis continua de HSPs, las denominadas HSPs constitutivas (HSPc). Otro grupo de estímulos actúan de forma ocasional generalmente en situaciones de estrés agudo. Ante estas situaciones se incrementa la síntesis de HSPs, las HSPs inducibles (HSPi).

La superfamilia de las HSPs agrupa una serie de familias que se clasifican de acuerdo con sus pesos moleculares: proteínas de alto, medio y bajo peso molecular. La familia HSPs70, de peso molecular medio, no sólo es

la más común sino también la más abundante de las caperona molecular, cuya función se explica más adelante. Los genes que codifican la familia HSP70, están muy conservados evolutivamente<sup>6</sup>. Las distintas isoformas de la HSPs70 difieren en sus niveles basales de expresión e inducción, y así, algunos de sus miembros se sintetizan de manera constitutiva como la HSP73 refiriéndose como HSP70c y otras, son inducidas por estrés como la HSP72 (HSP70i)<sup>1</sup>.

El papel citoprotector de las HSPs y en particular de la HSP70i, está extensamente documentado en una amplia variedad de enfermedades humanas, tales como desórdenes metabólicos<sup>7</sup>, inflamación<sup>8</sup>, infección<sup>9</sup> e isquemia.<sup>10</sup>

Las HSPs27, pertenecen a la familia de las HSPs de bajo peso molecular. Están básicamente implicadas en fenómenos de termotolerancia celular, intervienen en la estabilización del citoesqueleto evitando su desorganización en situaciones de estrés<sup>11</sup> y recientemente, se ha descrito para HSP 27, un papel protector frente a la apoptosis.<sup>12</sup>

Otros grupos importantes de HSPs son las ubiquitinas que se relacionan con la degradación de proteínas proteosómicas<sup>13</sup>, y la HSP 110 cuya función es la de caperona molecular.<sup>13</sup>

## 2.2. NOTAS HISTÓRICAS

El primer paso hacia el descubrimiento de la existencia de las HSPs se produjo gracias a los trabajos de Ritossa a principios de los años 60<sup>14</sup>. Este autor estudiaba las bases genéticas del desarrollo empleando células de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, que de forma característica presentan unos cromosomas politénicos gigantes, visibles con microscopía óptica. Ritossa observó que tras exponer las glándulas salivales a temperaturas superiores a las fisiológicas, se producían unos engrosamientos cromosómicos.

Años más tarde Tissières y colaboradores<sup>15</sup> demostraron que los engrosamientos descritos por Ritossa eran zonas de síntesis aumentada de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), y se debían al incremento de genes que denominaron genes de choque térmico. Las proteínas por ellos codificadas se identificaron como Heat Shock proteins (HSPs).

De forma paralela al descubrimiento de las HSPs se desarrolló el concepto de termotolerancia adquirida, descrito por primera vez por Gerner y Schneider<sup>16</sup>: las células sometidas a un tratamiento térmico no letal, adquirían resistencia a un posterior aumento letal de temperatura; la termotolerancia adquirida generalmente era transitoria. Entre los cambios producidos en estas células destaca el aumento de síntesis de HSPs<sup>17</sup>. Un agente o tratamiento que ocasione la inducción de la expresión de los genes de estrés confiere protección a la célula frente a posteriores exposiciones a agentes estresantes, incluso aunque no estén relacionados con el anterior<sup>13</sup>.

A finales de los años 70 se fueron acumulando pruebas que confirmaban que la respuesta de choque térmico constituía una propiedad general de todas

las células<sup>18</sup>: se produce aumento en la síntesis de HSPs en bacterias, levaduras, plantas, células animales cultivadas, tanto en respuesta al aumento de temperatura como a otros agentes estresantes tales como: metales pesados, alcoholes, venenos metabólicos, lo que indica el carácter universal de la HSR.

La caracterización y aislamiento de los genes que codifican las SPs se demostró de gran relevancia: muchos de los genes que codifican proteínas de estrés guardan gran homología en todos los organismos estudiados. Elisabeth A. Craig halló que los genes *hsps70* de bacterias, levaduras y *D.Melanogaster* eran homólogos en más de un 50% de su secuencia<sup>19</sup>. En conclusión; las proteínas de choque térmico se habían conservado a lo largo de la filogenética y cumplen la misma e importante función en todos los microorganismos.

Durante algún tiempo se mantuvo una cierta perplejidad ante el hecho de que estímulos tóxicos dispares provocasen un aumento de la síntesis de las mismas proteínas, lo que llevó a buscar un mecanismo de acción común que explicase esta paradoja. En 1980 Lawrence E. Hightower<sup>20</sup> observó que muchos de los agentes que inducían la HSR eran agentes desnaturalizantes proteicos, es decir, que alteraban la conformación normal de las proteínas y por tanto su función biológica. Este autor sugirió que la acumulación intracelular de proteínas desnaturalizadas era el estímulo que desencadenaba la HSR. También propuso que las proteínas de estrés facilitarían la identificación y eliminación de las proteínas desnaturalizadas<sup>41</sup>.

Esta teoría se confirmó pocos años más tarde gracias a los experimentos de Ananthan, Voellmy y Goldberg<sup>21</sup>: demostraron que la

inyección intracelular de proteínas desnaturalizadas era un estímulo eficiente para inducir la HSR.

En la década de los 80 se consiguieron purificar varias de las proteínas de estrés. Una de las más abundantes era la HSP70. Mediante el uso de sondas moleculares se demostró que la HSP70 se acumulaba de forma preferente en el nucleolo<sup>13</sup>; esto se debía a la presencia de partículas ribosómicas desnaturalizadas en el nucleolo de las células sometidas a estrés. De esta forma Pelham<sup>22</sup> sugirió que la función de la HSP70 podría ser reconocer proteínas intracelulares desnaturalizadas y devolverles su configuración biológicamente activa.

Este mismo autor identificó varios genes que codificaban proteínas similares a la HSP70. Una de ellas era idéntica a la denominada proteína de unión a inmunoglobulinas (*immunoglobulin binding protein* BiP)<sup>23</sup>. La BiP se une a la inmunoglobulina recién sintetizada conforme se va plegando y ensamblando para adoptar su forma madura; si la proteína fracasa en su plegamiento correcto, queda unida a la BiP y se elimina<sup>39</sup>. Se propuso que éste podía ser el mecanismo de acción común de todas las proteínas de estrés; asistir al plegamiento de otras proteínas, y facilitar su eliminación en caso de que éste fracasara<sup>13</sup>.

La caracterización de la HSP70 permitió también relacionar esta proteína con el fenómeno de termotolerancia. La microinyección de anticuerpos anti HSP70 en el interior de células de cultivo hacía que éstas fueran mucho más sensibles al aumento de temperatura, o lo que es lo mismo, perdían la termotolerancia<sup>24</sup>. Células transfectadas con el gen *hsp70* mostraban un

incremento de la tolerancia a la hipertermia<sup>25</sup>, de esta forma quedaba demostrada la relación entre las HSPs y la termotolerancia.

Costa Georgopoulos<sup>26</sup> observó que las mutaciones en dos genes relacionados con las proteínas de estrés denominados GroEl y GroEs, conferían resistencia de las bacterias frente a los virus que dependen de la maquinaria celular del huésped para su desarrollo. El funcionamiento incorrecto de estos genes impedía el ensamblaje intracelular de las partículas virales. Estas proteínas son similares a las proteínas de eucariotas denominadas HSP10 y HSP60. Se cree que HSP10 y HSP60 trabajan de forma coordinada para conseguir el ensamblaje correcto de otras proteínas. Debido a esta propiedad se empezó a denominar a estas proteínas carabinas o caperoninas moleculares<sup>39</sup>.



## **2.3. BIOLOGÍA DE LAS HSPS**

La principal función de las proteínas de choque térmico es, por tanto, asistir al correcto plegamiento de otras proteínas, la recuperación de proteínas anómalas, y por último la prevención de la agregación de las proteínas no plegadas y su eliminación en caso de que falle el plegamiento o la recuperación de la proteína sea imposible,<sup>13</sup>.

### ***2.3.1. Plegamiento de proteínas***

El plegamiento proteico y el ensamblaje correcto de las diferentes subunidades proteicas son esenciales para la supervivencia celular. Esta función se realiza en las células eucariotas y procariotas gracias a una maquinaria celular compleja que implica dos tipos de proteínas. La primeras serían enzimas convencionales que catalizan algunas reacciones específicas<sup>20</sup>.

El segundo tipo de proteínas son las caperonas moleculares (HSPs): estabilizan estructuras no plegadas o incompletamente plegadas y protegen de la interacción inadecuada entre cadenas polipeptídicas o dentro de la misma cadena polipeptídica, previniendo la agregación de cadenas de polipéptidos<sup>13</sup>.

Hay que recordar la teoría de Anfisen<sup>27,28</sup>: un polipéptido contiene toda la información necesaria para su plegamiento en su propia secuencia de aminoácidos. Sin embargo durante el proceso de plegamiento, las proteínas atraviesan por estados o conformaciones inestables durante los cuales es fácil que se produzca agregación o que fracase el proceso de plegamiento. La

función de las caperona molecular es proteger al resto de las proteínas cuando están en una situación inestable.

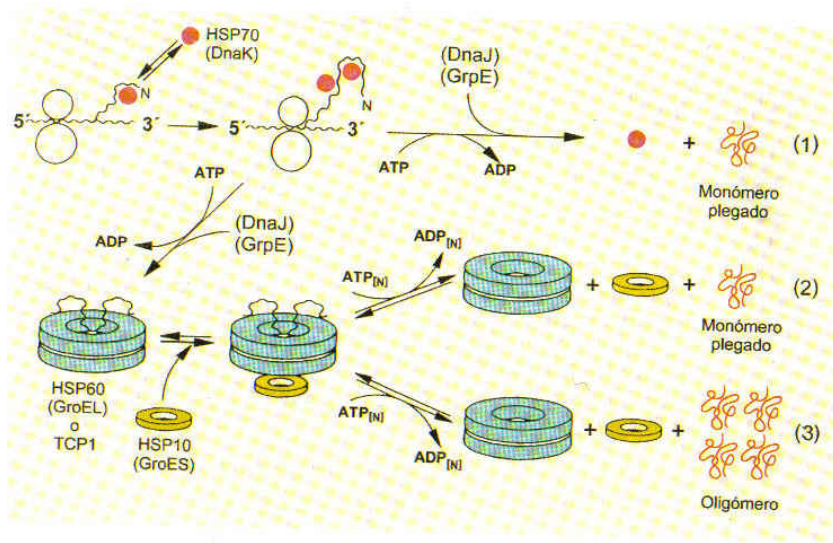


Fig 1 Modelo de plegamiento y ensamblaje asistido por HSPs. Durante la síntesis proteica las HSPs70 interactúan con la cadena polipeptídica naciente a medida que va emergiendo del ribosoma. Tal interacción previene el plegamiento prematuro e incorrecto.(1).

Algunas proteínas no requieren la asistencia de ninguna otra HSP. Otras son transferidas a las HSPs 60, en este caso el plegamiento se completa en el interior de la estructura de la HSP60 con la asistencia de las HSPs10 y la hidrólisis de ATP. Las HSPs60 pueden asistir al plegamiento de proteínas monoméricas (2) y poliméricas (3)<sup>13</sup>.

Cada una de las HSPs presenta un tipo de interacción diferente con las demás proteínas. Así, por ejemplo, la HSP70 interactúa con la cadena polipeptídica a medida que va siendo formada en el ribosoma. Tal interacción previene el plegamiento prematuro e incorrecto de la nueva proteína<sup>29</sup>. La HSP60, sin embargo, tiene una estructura con dos anillos, compuestos por 7 subunidades cada uno, que forman una estructura toroide; la proteína asistida, parcialmente plegada, se introduce en su interior, donde se continúa el plegamiento proteico al mismo tiempo que se protege de la interacción con

otras proteínas<sup>30</sup> (fig 1), finalizado el cual se produce la disociación<sup>31</sup>. La HSP10 es cofactor de la HSP60<sup>13,21</sup>.

Una característica importante de las HSPs es que precisan de la hidrólisis del ATP para su funcionamiento<sup>32,33</sup>. Las HSP70, 60 (esta última asociada a la HSP10) HSP90 y 110 necesitan del ATP para disociarse de la proteína que está adquiriendo su configuración (fig. 1). Algunas HSPs, especialmente las de más bajo peso molecular, parecen no ser ATP-dependientes<sup>34</sup>: actúan como enlazadores pasivos de las proteínas alteradas.

### ***2.3.2. Transporte de proteínas***

Las caperonas moleculares por tanto, se unen y estabilizan la conformación inestable de otras proteínas mediante uniones y liberaciones controladas, facilitando así su destino correcto. Este destino incluye varias etapas; no sólo el plegamiento y ensamblaje oligomérico, si no también su transporte al compartimento intracelular adecuado y, si se precisa, su degradación<sup>35</sup>.

En la figura 2 se describe un modelo de transporte de proteínas desde el citoplasma a la mitocondria asistido por proteínas de la familia HSP70. Así las caperonas moleculares del citosol son fundamentales en el transporte y plegamiento de proteínas que van a ser traslocadas a otras organelas como el núcleo o las mitocondrias<sup>36</sup>, asegurando que durante el procedimiento que implica la desconfiguración y posterior replegamiento de la proteína transportada se produzca sin errores.

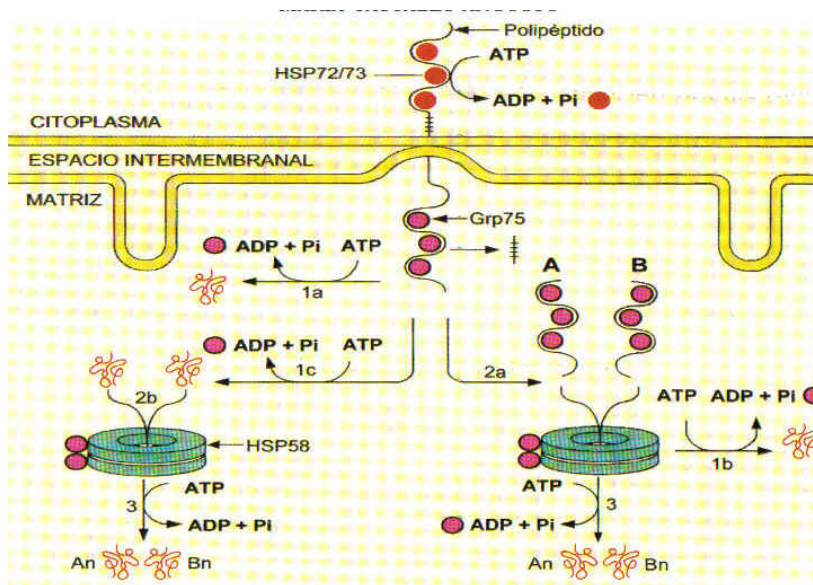


Fig 2. Modelo que describe el transporte de proteínas a la mitocondria, su plegamiento y ensamblaje. Las proteínas con destino a la mitocondria se mantienen en su forma desdoblada gracias a la interacción con HSP72/HSP73. El paso de la membrana se acompaña de la liberación de las HSPs70 y la unión a Grp75. Finalmente se produce el plegamiento asistido (2 y 3) o no (1) por las HSPs60<sup>13</sup>.

### 2.3.3. Reparación de proteínas alteradas

Un gran grupo de proteínas de choque térmico funcionan como caperones moleculares en la reparación de las proteínas lesionadas.

Entre estas se incluyen las siguientes familias: HSP70, HSP90, HSP104, HSP40, HSP27 y las alfa-cristalinas<sup>13</sup>. La mayoría de estas proteínas son constitutivas, encargadas de asegurar el plegamiento proteico adecuado y transportar las proteínas a la organela intracelular dónde deben realizar su función. Sin embargo, en condiciones adversas que causen una amplia lesión de las proteínas celulares, la célula necesita aumentar la síntesis de estas proteínas para reparar o eliminar las proteínas dañadas<sup>37</sup>.

HSPs70 y HSPs40 pueden catalizar el replegamiento de proteínas desnaturalizadas total o parcialmente y recuperar su forma activa mediante un proceso que implica la hidrólisis de ATP.

Algunas HSPs tienen la capacidad de deshacer agregados intracelulares de proteínas solubles y acelerar el replegamiento de estas proteínas para recuperar su forma soluble activa<sup>38</sup>.

Además de las HSPs existen otras proteínas encargadas de proteger a la célula frente a agentes estresantes e incluso de reparar las proteínas dañadas, como son la superóxido dismutasa, hemooxigenasa y la catalasa <sup>13</sup>.

#### ***2.3.4. Degradación de proteínas dañadas***

Durante mucho tiempo se ha considerado que la degradación proteica era un proceso poco específico. Sin embargo, hoy en día se sabe que es un mecanismo necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular<sup>13</sup>.

Las proteínas que presentan alteraciones en su plegamiento deben ser destruidas ya que presentan una gran tendencia a formar agregados, lo que es altamente lesivo para la célula. Además, la degradación proteica es una vía que puede emplear la célula para controlar ciertas actividades, en concreto se puede controlar la degradación o no de proteínas efectoras o reguladoras de otras funciones<sup>31</sup>. El control de la degradación de proteínas es importante a nivel inmunológico, ya que el sistema inmune basa su respuesta en el reconocimiento de fragmentos proteicos procedentes de la degradación de proteínas foráneas<sup>31</sup>.

Este sistema debe estar estrictamente controlado para evitar la destrucción masiva de proteínas útiles para la célula. Una de las estrategias

que emplea es la compartimentalización: organelas específicas para llevar a cabo la proteólisis. Una de las más relevantes son los lisosomas. Las HSPs tienen un papel muy importante a la hora de seleccionar qué proteínas son las que van a ser degradadas. Se ignora todavía cuál es el mecanismo por el cual se decide si una proteína va a ser renaturalizada o degradada<sup>13</sup>. Una posibilidad es que la degradación o no de la proteína dañada esté en relación con el tiempo de unión con las HSPs. Si la proteína recupera su conformación tridimensional se produce la disociación de la HSP y no se degrada. Si el daño es tan importante que no se puede recuperar la configuración tridimensional no se produce la disociación y como consecuencia la proteína queda marcada para su degradación<sup>39</sup>. La HSP73c (constitutiva) y la ubiquitina son las HSPs más activas en la degradación de proteínas. La HSP73c regula el transporte de proteínas dañadas hacia el interior de las organelas dónde se va a producir la degradación; en este caso mitocondria y lisosomas<sup>13</sup>. Las ubiquitinas reconocen las proteínas que van a ser degradadas, se unen de forma covalente a las mismas en residuos de lisina de la cadena polipeptídica, y se forman cadenas de ubiquitina a partir de estas primeras uniones<sup>40,41</sup>. Esta unión se realiza mediante un complejo multienzimático. Las proteínas portadoras de cadenas de poliubiquitinas son reconocidas por un sistema de proteasas denominado proteosoma que se ocupa de la degradación de las proteínas<sup>13</sup>.

## 2.4. CLASIFICACIÓN DE LAS HSPS

Las HSPs se clasifican no sólo por su peso molecular: alto (HSP110, HSP90), medio (HSP70, HSP60/HSP10, HSP 40), bajo (HSP 33, HSP 27, ubiquitina y cristalinas), si no también por su función (tabla 1):

Nombre	Homólogo en bacterias	Función
<b>HSP110/104</b>	HSP 110/104	Caperona molecular
<b>HSP 90</b>	HtpG	Caperona molecular. Receptor de hormonas esteroideas
<b>Grp 78 (BiP)</b>	DnaK	Caperona molecular constitutiva.
<b>HSP 75</b>	DnaK	Caperona molecular constitutiva
<b>HSP 73</b>	DnaK	Caperona molecular constitutiva
<b>HSP 72</b>	DnaK	Caperona molecular inducible
<b>HSP 60</b>	GroEL	Caperonina molecular.
<b>HSP 40/GrpE</b>		Cofactores de HSP 70
<b>HSP 47</b>		Caperona del colágeno
<b>HSP 33</b>		Caperona molecular. Estrés oxidativo
<b>HSP 20-30</b>		Estabilización de actina. Termotolerancia Transducción de señales. Protección frente a la oncogénesis y apoptosis
<b>HSP 10</b>	GroES	Cocaperonina de HSP 60
<b>Cristalinas</b>		Caperonas. Implicación en enfermedades neurológicas
<b>Ubiquitina</b>		Degradación de proteínas

Tabla 1 HSPs y su función

### 2.4.1. HSP110

La familia de HSPs de mayor peso molecular está integrada por la HSP110 y la Grp170. Aunque estructuralmente son similares a las HSPs70<sup>42</sup>, no se conoce muy bien como realizan su función<sup>43</sup>: se sabe que actúan de forma conjunta con otras HSPs (HSP70, HSP90) como caperona molecular<sup>14,44,45</sup>, y que su ausencia es letal para la célula<sup>14</sup>.

#### **2.4.2. HSP90**

Funciona como caperona molecular en el plegamiento de proteínas, entre las que se incluyen los receptores de hormonas esteroideas, quinasas y la p53<sup>13</sup>.

La mayoría de los sustratos de la HSP90 son proteínas señalizadoras. El déficit de función de HSP90 produce profundas alteraciones en la evolución del ciclo celular<sup>46</sup>.

#### **2.4.3. HSPs70**

La familia de las HSPs70 (en eucariotas: HSP68, HSP72, HSP73 y GRP78), son un grupo de ATPasas muy conservadas en la escala filogenética, especialmente en su dominio N-terminal (ATPasa) y en el sitio de unión al sustrato<sup>13</sup>.

La característica más importante del funcionamiento de las HSPs70 son los ciclos de unión y liberación de moléculas sustrato (proteínas sin configuración espacial adecuada), dependiente de ciclos de hidrólisis del ATP y de cambios conformacionales<sup>47</sup>. Las HSPs70 son esenciales en el plegamiento de proteínas, unión y desunión de oligómeros, traslocación de proteínas o degradación de las mismas<sup>48</sup>.



#### **2.4.4. HSP60/HSP10**

Las proteínas HSP60 y HSP10 (denominadas GroEl y GroEs respectivamente en procariontas) actúan como caperoninas: forman un complejo proteico esencial para la adquisición de la estructura terciaria de otras proteínas, especialmente las de tamaño entre 20 y 60 Kd, con dominios extensos con estructura  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina, y zonas hidrofóbicas extensas<sup>49</sup>

#### **2.4.5. HSP40 y GrpE (cofactores)**

Las proteínas HSP40 y GrpE son colaboradores necesarios para la función de la HSP70<sup>50,51</sup>. La proteína HSP40 estimula la función ATPasa de las HSPs70<sup>13</sup>.

#### **2.4.6. HSP33**

La HSP33 es una SP de bajo peso molecular cuyo mecanismo de acción es diferente al del resto de HSPs. En condiciones normales se encuentra en forma reducida inactiva. Cuando se somete a un ambiente oxidativo se produce un cambio conformacional que incluye la liberación de un átomo de zinc y se activa<sup>13,52,53</sup>. Se trata por tanto de una HSP activa y eficaz frente al estrés oxidativo. Su expresión se incrementa también tras el choque térmico<sup>13,24,25</sup>.

#### **2.4.7. HSP27**

Las HSP27 son unas proteínas de peso molecular relativamente bajo (27.000 Kd) que en el ser humano presentan 4 isoformas diferentes (A,B,C y D). Han sido detectadas de forma constitutiva en varios tejidos humanos, incluidos los PMNs, con diferentes niveles de expresión<sup>11,54</sup>

Las HSP27 han sido implicadas en fenómenos de termotolerancia, mediante la estabilización de la actina durante el choque térmico<sup>7,54</sup>, la transducción de señales<sup>55</sup>, la embriogénesis, y se describe un posible papel protector frente a la oncogénesis y la apoptosis<sup>56</sup>.

#### **2.4.8. Cristalinas**

Las cristalinas son caperoninas de bajo peso molecular detectadas por primera vez en estructuras del ojo. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de su presencia fuera del globo ocular y de su implicación en enfermedades principalmente neurológicas<sup>57,58</sup>.

#### **2.4.9. Ubiquitina**

Las ubiquitinas son un grupo de proteínas de pequeño peso molecular que forman parte del denominado sistema ubiquitina/proteosoma de degradación de proteínas. Están implicadas en la regulación de numerosas funciones intracelulares a través del control de la eliminación o mantenimiento de las proteínas implicadas en los mismos<sup>13,59,60,61</sup> (transducción de señales, reparación de DNA, mantenimiento de los cromosomas, activación de la transcripción, progresión del ciclo celular, supervivencia de la célula, apoptosis, ciertas funciones inmunitarias o eliminación de proteínas dañadas o mal configuradas<sup>62</sup>).

## 2.5. REGULACIÓN DE LAS HSPs

La respuesta celular al estrés se caracteriza por su rapidez y su falta de especificidad. Es importante por lo tanto una regulación de su actividad muy precisa, pero que al mismo tiempo sea lo suficientemente flexible como para responder a las distintas formas de agresión celular de una forma inmediata<sup>13</sup>.

La activación transcripcional de los genes de la respuesta de choque térmico se realiza por medio de los denominados factores del choque térmico (*Heat Shock factors*, HSFs)<sup>5</sup>.

Se conocen 4 tipos diferentes de HSFs en humanos. El HSF1, se activa en respuesta a determinadas formas de estrés<sup>5</sup>, a diferencia del HSF2 que parece estar más relacionado con el desarrollo<sup>5,63</sup>. El HSF3 es una molécula con capacidad para responder al calor, que se ha descrito en aves<sup>13,64</sup>. Recientemente se ha descubierto en humanos el HSF4, cuya función no está bien definida, si bien se ha podido comprobar que carece de capacidad para activar la transcripción, por lo que su función bien podría ser reguladora de la función de los HSF1 y HSF2<sup>65</sup>.

Los HSFs, en concreto el HSF1 cuya estructura es la mejor conocida, poseen dos dominios muy conservados a lo largo de la evolución<sup>5</sup>. El primero es un dominio de unión a ADN: los HSFs se unen a zonas específicas del ADN denominadas *elementos de choque térmico* (*Heat Shock Elements* HSEs); la unión de los HSFs a los HSEs activa la expresión de los genes hsp<sup>66</sup>. El segundo es un dominio de oligomerización (en este caso trimerización)<sup>5,67</sup>. La

forma monomérica es inactiva, para poder llevar a cabo su función es necesario que se formen trímeros. La forma polimerizada tiene la facultad de traslocarse al núcleo, unirse a los HSEs y activar la transcripción de los genes hsp<sup>5,68</sup>.

No está claro cuál es el mecanismo mediante el cual se activan los HSFs. Una de las teorías más aceptadas es que los HSFs se unen a las HSPs cuando la célula está en reposo. El aumento en la concentración de las proteínas desnaturalizadas produce un aumento de la demanda de HSPs en sus funciones de caperización, lo que conlleva a la disminución de la concentración intracelular de HSPs, y a la liberación de HSFs en el citosol. Este aumento de concentración facilita la trimerización, y la activación de la transcripción<sup>5,13,67</sup>. (fig3).

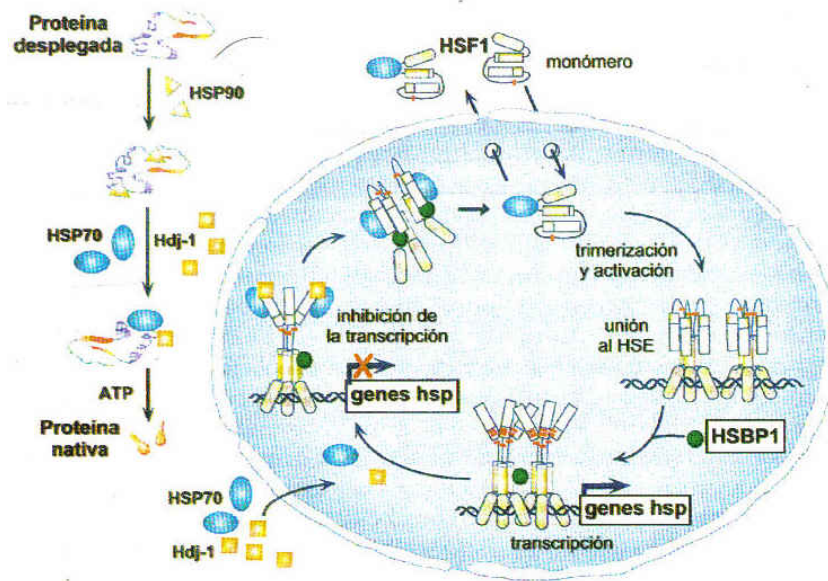


Fig 3. Regulación de la respuesta al choque térmico y ciclo del HSF. La activación del HSF va unida a la aparición de proteínas no plegadas y al requerimiento celular de la asistencia de las HSPs, para prevenir la agregación de estas proteínas. El HSF existe en estado normal en el citoplasma o en el núcleo como monómero inerte, cuya capacidad para unirse al ADN está bloqueada por interacciones con las HSPs. La disociación de las HSPs se asocia a un proceso que termina en la oligomerización de los HSFs y finalmente a la activación de su capacidad para unirse al ADN de forma que estimulan la transcripción de genes de HSPs. El aumento de HSPs actúa como un sistema de regularización negativa inhibiendo, finalmente, la capacidad de estimular la transcripción del HSF<sup>13</sup>.

## 2.6. HSPs Y RESPUESTA INMUNE

### 2.6.1. Fisiología de la respuesta inmune<sup>69-72</sup>

Los organismos superiores están en contacto continuo con numerosos organismos patógenos. Para controlarlos se dispone de un complejo sistema defensivo: el sistema inmune.

El sistema inmune responde a la presentación de moléculas extrañas mediante la generación de sustancias “específicas” para cada una de esas moléculas. Éstas son de dos tipos:

1. *Anticuerpos*: son producidos por los *linfocitos B* y son capaces de reconocer la sustancia patógena de forma directa.
2. *Receptores de células T*: se expresan en la superficie de los linfocitos T y reconocen la sustancia patógena de forma indirecta.

El elemento patógeno reconocido por los receptores y los linfocitos B se denomina *antígeno*. Los anticuerpos reconocen estos antígenos de forma directa, el reconocimiento por parte de los linfocitos T requiere del procesamiento del antígeno por parte de células presentadoras de antígenos y su expresión en la superficie junto a una molécula del *complejo mayor de histocompatibilidad (Major histocompatibility System MHC)*.

Existen dos clases de MHC:

1. *MHC clase I*: se expresa prácticamente en cualquier célula del organismo y es reconocido por los linfocitos T CD8+. Este tipo de receptores raramente presentan antígenos relacionados con el sistema HSPs.

2. *MHC clase II*: presentes sólo en un número limitado de células que en general pertenecen al *sistema mononuclear fagocítico*. Este tipo de células presentan los antígenos a los linfocitos T CD4+. Existen dos tipos.

a. *Linfocitos T CD4+ helper* capaces de producir citocinas con múltiples funciones; entre otras la estimulación de los linfocitos B para que produzcan anticuerpos.

b. *Linfocitos T CD4+ citolíticos* capaces de destruir la célula contaminada.

Todos estos tipos de linfocitos presentan un receptor compuesto por una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$ .

Otros linfocitos poseen un receptor compuesto por cadenas  $\gamma$  y  $\delta$ . La función de estos linfocitos está menos estudiada aunque posiblemente esté relacionada con funciones de control y eliminación de células aberrantes. Se cree que para realizar estas funciones reconocen estructuras propias, incluidas las HSPs.

De una forma breve podemos clasificar los agentes patógenos en tres tipos:

- *Patógenos extracelulares*: (generalmente capaces de secretar toxinas), el organismo se defiende contra ellos mediante los anticuerpos.
- *Patógenos intracelulares*: cuyo control se hace mediante los linfocitos T.

- *Virus*: se emplean ambas vías dependiendo de la localización. En este apartado se podrían encuadrar los priones, aunque los mecanismos defensivos contra ellos todavía no están claros.

### 2.6.2. HSPs y enfermedades infecciosas

Como ya se ha expuesto previamente las HSPs son moléculas muy conservadas a lo largo de la escala filogenética<sup>13,70,73,74</sup>. Por ello, las HSPs de los microorganismos infecciosos son una posible diana para la respuesta inmunológica, de hecho se ha descrito una respuesta inmune contra las HSPs en enfermedades infecciosas<sup>71</sup>: tuberculosis, lepra, malaria, fiebre Q, brucelosis o sífilis; la agresión inmunológica pueda afectar tanto a las HSPs del organismo agresor como a las del huésped<sup>71,75</sup>.

AGENTE INFECCIOSO	ENFERMEDAD
<i>Borrelia burdorferi</i>	Enfermedad de Lyme
<i>Brugia malayi</i>	filariasis linfática
<i>Chlamydia trachomatis</i>	tracoma
<i>Legionella pneumophila</i>	legionelosis
<i>Leishmania donovani</i>	leishmaniasis visceral
<i>Leishmania major</i>	leishmaniasis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculosis
<i>Mycobacterium leprae</i>	lepra
<i>Onchocerca volvulus</i>	oncocercosis
<i>Plasmodium falciparum</i>	malaria
<i>Schistosoma mansoni</i>	esquistosomiasis
<i>Trypanosoma cruzi</i>	enfermedad de Chagas
<i>Trypanosoma bruzi</i>	tripanosomiasis

tabla 2 enfermedades infecciosas en las que las HSPs son los antígenos dominantes.



### **2.6.3. HSPs y respuesta inmunológica al estrés**

Según la teoría de la “señal de peligro” elaborada por Matzinger<sup>76</sup> el sistema inmune puede activarse en respuesta a sustancias endógenas liberadas a partir de tejidos dañados o sometidos a estrés, como las HSPs<sup>77</sup> que son captadas por células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells APCs*) y reconocidas por los linfocitos T<sup>78</sup>; los linfocitos de tipo  $\gamma\delta$  son especialmente afines por las HSPs<sup>71</sup>.

En la actualidad se considera que la respuesta autoreactiva contra las HSPs puede ser fisiológica, e importante en el control y vigilancia inmunológica en el organismo<sup>79</sup>. En cualquier caso todavía no está claro cuál es la importancia de este tipo de reacciones inmunológicas.

### **2.6.4. Inmunidad humoral y HSPs**

Una de las mayores incógnitas en este campo es por qué se producen anticuerpos contra unas proteínas que teóricamente aparecen sólo en el espacio intracelular.

Diversos estudios relacionan la presencia de anticuerpos anti HSPs y diferentes patologías infecciosas<sup>71</sup>, cardiovasculares<sup>80</sup> (en concreto la cardiopatía isquémica<sup>81,82</sup> y la hipertensión<sup>83,84</sup>), tumorales<sup>71</sup>, autoinmunes<sup>85</sup> (como la artritis reumatoide, lupus, la enfermedad de Graves o la tiroiditis de Hashimoto<sup>69</sup>), rechazo de órganos<sup>86</sup> etc. Incluso hay estudios que relacionan la presencia de anticuerpos anti-HSP con el estrés ambiental<sup>84</sup>. También se ha podido demostrar la presencia de este tipo de anticuerpos en individuos sanos,

por lo que se puede pensar que forman parte de la reserva de anticuerpos naturales<sup>87</sup>.

El significado de este tipo de respuesta autoinmune no está claro en el momento actual, por lo cual se necesitarán más estudios para llegar a clarificarlo<sup>79</sup>.

## **2.7. BIOLOGÍA DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES**

### **2.7.1. Fisiología<sup>88,89,90</sup>**

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) son células implicadas en la defensa del organismo frente a la agresión: su función principal es la destrucción de bacterias. También se relacionan con la inflamación, la regulación de la respuesta inmune innata, y posiblemente tengan un papel en la defensa del organismo contra los virus.

### **2.7.2. HSPs y PMNs**

La presencia de sustancias oxidantes en los gránulos de los PMNs provoca la existencia de un medio interno poco favorable para la supervivencia de la propia célula, lo que justifica la elevada concentración intracelular de HSPs que garantizan la estabilidad de las proteínas vitales en los neutrófilos<sup>90</sup>.

Ante una situación de agresión que provoca estrés oxidativo, como la cirugía, infección<sup>91</sup>, traumatismo<sup>92</sup> o quemaduras<sup>93</sup>, los PMNs responden de forma inmediata poniendo en marcha todos los mecanismos defensivos de primera línea, y entre ellos la inducción rápida de HSPs, especialmente HSP27, HSP70 y HSP90<sup>92</sup>. Ello, junto con la fácil accesibilidad para la obtención de estas células hace de los PMNs eficaces biosensores del estrés celular.

Diversos estudios relacionan las HSPs con la regulación de la apoptosis en PMNs, sin embargo las conclusiones de los diferentes estudios son contradictorias. Unos afirman que las HSPs potencian la apoptosis<sup>94,95</sup> y otros que la inhiben<sup>96,97</sup>.

## **2.8. RESPUESTA AL ESTRÉS**

La respuesta celular al estrés quirúrgico y anestésico, cuyo estudio es el principal objetivo del presente trabajo, emplea complejos mecanismos: durante la misma se producen alteraciones a nivel endocrino, neurológico e inmunológico, por lo cual se puede hablar de una respuesta neuroinmunoendocrina frente al estrés.

### **2.8.1. Respuesta neuroendocrina<sup>98,99</sup>**

Cualquier agente agresor genera una reacción que tiene como objetivo restaurar la homeostasis. Estos cambios se llevan a cabo mediante dos sistemas efectores<sup>100,101</sup> : el sistema hipotálamo-hipofisario-adrenal y el sistema simpático adreno-medular.

#### **2.8.1.1. Sistema hipotálamo hipofisario adrenal (SPHA).**

Controla la producción de varias hormonas. En nuestro caso son importantes la hormona liberadora de corticotropina (*Corticotropin-releasing hormone*, CRH) y la vasopresina. Estas dos hormonas actúan de forma sinérgica para promover la liberación de corticotropina (*Adrenocorticotropic Hormone*, ACTH), que a su vez actúa estimulando la síntesis de cortisol (y aldosterona) por la glándula suprarrenal.

#### **2.8.1.2. Sistema simpático adrenal medular (SSAM)**

El sistema nervioso simpático (central y periférico), controlado desde el locus cerúleus en el tronco del encéfalo, activa a nivel de la médula

suprarrenal la liberación de catecolaminas a la circulación periférica, principalmente adrenalina.

El incremento del tono simpático en otros órganos efectores incrementa también la concentración de catecolaminas en sangre, fundamentalmente noradrenalina.

### **2.8.1.3. Regulación**

Los dos sistemas (SPHA y SSAM) se encuentran sometidos a diversos mecanismos de regulación<sup>98</sup>:

1. Activación mutua.
2. Autorregulación (cada sistema se inhibe a sí mismo).
3. Sistemas activados por serotonina, acetilcolina y mediadores de la respuesta inflamatoria (IL 1, IL 6 y TNF $\alpha$ ).
4. Sistemas inhibidos por la activación de vías gabaérgicas [(*Gamma-aminobutyric acid*, (GABA)], opiáceos y endorfinas.

La respuesta neuroendocrina modifica el grado de alerta, la atención y otras funciones superiores en el paciente vigil mediante su acción activadora de diferentes sistemas: dopaminérgico mesocortical-mesolímbico, amigdalino-hipocampo y el proopiomelanocortínico principalmente<sup>98</sup>.

### **2.8.1.4. Alteraciones metabólicas<sup>98,99</sup>**

- **Metabolismo de carbohidratos**

Los estados de estrés se suelen acompañar de hiperglucemia, producida por el incremento de los niveles de catecolaminas, cortisol y glucagón, el descenso de los niveles de insulina, y resistencia periférica a la misma.

Los tejidos inflamados, leucocitos y el sistema retículo-endotelial aumentan consumo anaerobio de glucosa, con el consiguiente incremento de producción de lactato<sup>98,99</sup>.

- **Metabolismo proteico**

Se produce un balance nitrogenado negativo, a causa del aumento de los niveles de cortisol<sup>98,99</sup>.

- **Metabolismo lipídico**

La grasa es el principal combustible metabólico en situaciones de estrés. Aumentan los niveles de cuerpos cetónicos y de ácidos grasos libres debido a la acción de las tres hormonas contrainsulares: catecolaminas, glucagón y corticoides<sup>98,99</sup>.

### **2.8.2. Respuesta inmunológica/inflamatoria**

La inflamación es una de las respuestas del organismo a la agresión anestésicoquirúrgica; Se trata de una respuesta rápida, controlada y amplificada mediante mecanismos reguladores humorales y celulares<sup>102,103</sup>.

La respuesta inflamatoria sistémica se manifiesta con fiebre o hipotermia, leucocitosis, leucopenia o aparición de formas inmaduras en el recuento leucocitario, taquicardia y taquipnea (Tabla 3). Este tipo de respuesta inflamatoria es muy similar a la que se observa en caso de sepsis, la única diferencia es la existencia de una infección subyacente<sup>102,103</sup>.

Temperatura	>38°C ó <36°C
Frecuencia cardiaca	>90 latidos/minuto
Frecuencia respiratoria	>20 respiraciones/minuto o pCO <sub>2</sub> < 32 mmHg
Leucocitos	>12.000/mm <sup>3</sup> ó <4.000/mm <sup>3</sup> ó >10% de formas inmaduras

*Tabla 3. Criterios diagnósticos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (systemic inflammatory response syndrome SIRS), se deben cumplir 2 ó más de dichos criterios<sup>102</sup>.*

### **2.8.3. Factores que activan la respuesta inflamatoria**

Al igual que la respuesta neuroendocrina, la respuesta inflamatoria se puede desencadenar con intensidad variable ante cualquier estímulo agresor: trauma quirúrgico<sup>104</sup>, pérdida de sangre, transfusiones, hipotermia, isquemia-reperfusión<sup>102,103</sup> o ventilación agresiva<sup>105,106,107</sup> (ventilación unipulmonar) entre otros.

### **2.8.4. Componentes de la respuesta inflamatoria**

#### **2.8.4.1. Sistema del complemento**

El complemento se activa en respuesta a la agresión quirúrgica a través de la vía alternativa. El resultado final es el aumento de las concentraciones plasmáticas del denominado complejo de ataque a membrana (C5b-C9). El incremento de las concentraciones plasmáticas de factores activados del complemento se correlaciona con mayor incidencia de disfunción multiorgánica<sup>108</sup>. (fig 4).

#### **2.8.4.2. Citoquinas**

Las citoquinas o interleuquinas (ILs) son proteínas solubles y polipéptidos que actúan como mediadores paracrinós del sistema inmune y

son producidas por diferentes tipos celulares entre las que se incluyen PMNs, linfocitos, monocitos y células endoteliales<sup>109</sup>.

Cada tipo de citoquina puede ejercer acciones proinflamatorias o antiinflamatorias (Tablas 4 y 5). Las citoquinas proinflamatorias juegan un papel importante a la hora de estimular la respuesta inmune a la agresión quirúrgica; las más relevantes son las IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y el TNF- $\alpha$  (tabla 4). La elevación persistente de dichas citoquinas es un marcador de mal pronóstico<sup>110,111</sup>.

La IL-6 es una citoquina multifuncional involucrada en la activación de las respuestas inmunes de las células B y T, la hematopoyesis y la inflamación. Se sabe que aumenta en paralelo a las proteínas de fase aguda. Su concentración comienza a aumentar a las 2-4 horas de la incisión cutánea, el pico máximo se encuentra de 6 a 24 horas después. La respuesta es proporcional a la extensión de la cirugía<sup>104,112</sup>.

Entre las citoquinas antiinflamatorias cabe destacar la interleuquina 10 (IL-10), un potente inhibidor de la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y el TNF- $\alpha$ <sup>113</sup>. El papel del resto de las citoquinas antiinflamatorias no está aún bien definido (tabla 5).

#### **2.8.4.3. Oxido Nítrico**

El óxido nítrico (*Nitric oxide* NO) es un mediador biológico ampliamente sintetizado en el endotelio vascular, cuya función más relevante es la vasodilatación de la circulación sistémica y pulmonar; inhibe la adhesión y agregación plaquetaria y las interacciones entre leucocitos y endotelio, lo



<b>Citoquina</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Macrófagos, monocitos, células B y T, mastocitos, células endoteliales	Mediador primario en la respuesta inflamatoria. Provoca la clínica del SRIS. Libera citoquinas proinflamatorias. Libera neutrófilos (desde médula osea). Activa monocitos, complemento y coagulación. Síntesis de moléculas de adhesión en endotelio. Produce proteínas de fase aguda. Pirógeno endógeno.
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Macrófagos, monocitos, células endoteliales	Mediador primario en la respuesta inflamatoria. Inicia la respuesta mediada por células; activación de linfocitos T y macrófagos. Expresión de iNOS, liberación de prostaglandinas, inhibición de la lipoproteinlipasa. Activa la coagulación Libera citoquinas proinflamatorias. Síntetiza moléculas de adhesión en endotelio. Produce proteínas de fase aguda. Pirógeno endógeno.
<b>IL-6</b>	Macrófagos, Células T <i>helper</i>	Mediador tardío de la respuesta inflamatoria. Activa linfocitos B y T. Produce proteínas de fase aguda. Pirógeno endógeno.
<b>IL-8</b>	Macrófagos, Células T, células endoteliales	Mediador tardío de la respuesta inflamatoria. Quimiotaxis de neutrófilos, basófilos y células T. Regula la función de los neutrófilos.

Tabla 4. Citoquinas proinflamatorias TNF: factor de necrosis tumoral, IL: interleuquina, iNOS: sintetasa inducible de óxido nítrico<sup>103</sup>.

que sitúa al NO como una molécula clave en la regulación de la inflamación<sup>114,115</sup>. Se ha propuesto que el óxido nítrico posee, entre otras,

propiedades inmunomoduladoras y quelantes de radicales libres de oxígeno<sup>116,117</sup>.

<b>Citoquina</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>
<b>IL-10</b>	Macrófagos	Limita la respuesta inflamatoria. Inhibe la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . Regula a la baja la expresión de HLA-DR en monocitos
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Macrófagos, linfocitos y plaquetas	Regula a la baja la producción de citoquinas proinflamatorias. Reduce la activación de linfocitos
<b>IL-1ra</b>	Porción soluble de un receptor	Inhibidor específico de IL-1 $\beta$ .
<b>TNF-sr1 y TNF-sr2</b>	Porción soluble de un receptor	Antagonista específico de TNF- $\alpha$

*Tabla 5. Citoquinas antiinflamatorias. IL: interleuquina. TGF: factor transformador de crecimiento. IL-1ra: antagonista del receptor de IL-1. TNF-sr: receptor soluble del factor de necrosis tumoral. HLA: antígeno de leucocitos humano<sup>103</sup>.*

#### **2.8.4.4. Cascada de la coagulación**

La coagulación es un proceso íntimamente ligado a la respuesta inflamatoria sistémica. La activación de la coagulación es un proceso fundamental en la respuesta inflamatoria sistémica y viceversa.

La homeostasis de la coagulación implica un delicado equilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulantes. El objetivo de la coagulación es la formación de agregados insolubles de fibrina, que se eliminan posteriormente gracias al sistema de la fibrinólisis (fig 5).

Durante la agresión anestésico-quirúrgica varios agentes activan la coagulación. La lesión endotelial y la liberación de citoquinas activan la coagulación<sup>118</sup>, y a su vez la activación de la coagulación puede aumentar la liberación de factores inflamatorios, lo que eventualmente puede producir un círculo vicioso que conduzca al agravamiento de la situación de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (*systemic inflammatory response syndrome SIRS*)<sup>117</sup>.

#### **2.8.4.5. El endotelio**

El endotelio es fundamental en la fisiopatología de la respuesta inflamatoria. Entre sus funciones destaca la regulación del tono y la permeabilidad vascular, el control de la coagulación, la fibrinólisis y la agregación plaquetaria, y el control de la migración de los leucocitos hacia las zonas en las que se está produciendo la inflamación.

Algunas citoquinas proinflamatorias como el  $\text{TNF}\alpha$ , la  $\text{IL-1}\beta$  y la  $\text{IL-6}$ , son capaces de activar el endotelio<sup>117</sup>.

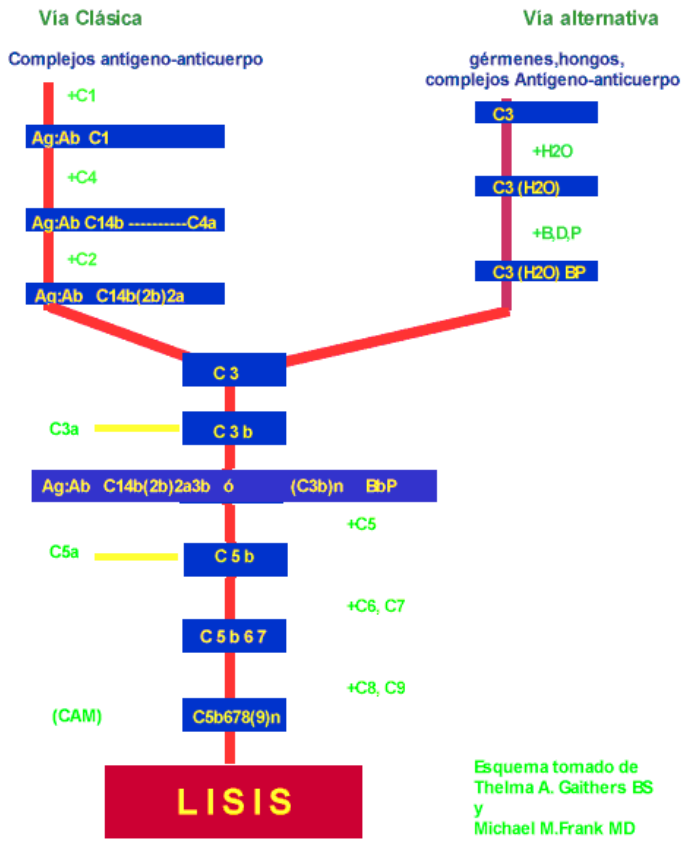


Fig 4 Sistema del complemento.

<http://www.medynet.com/usuarios/nnuneza/virologia/complemento.gif>

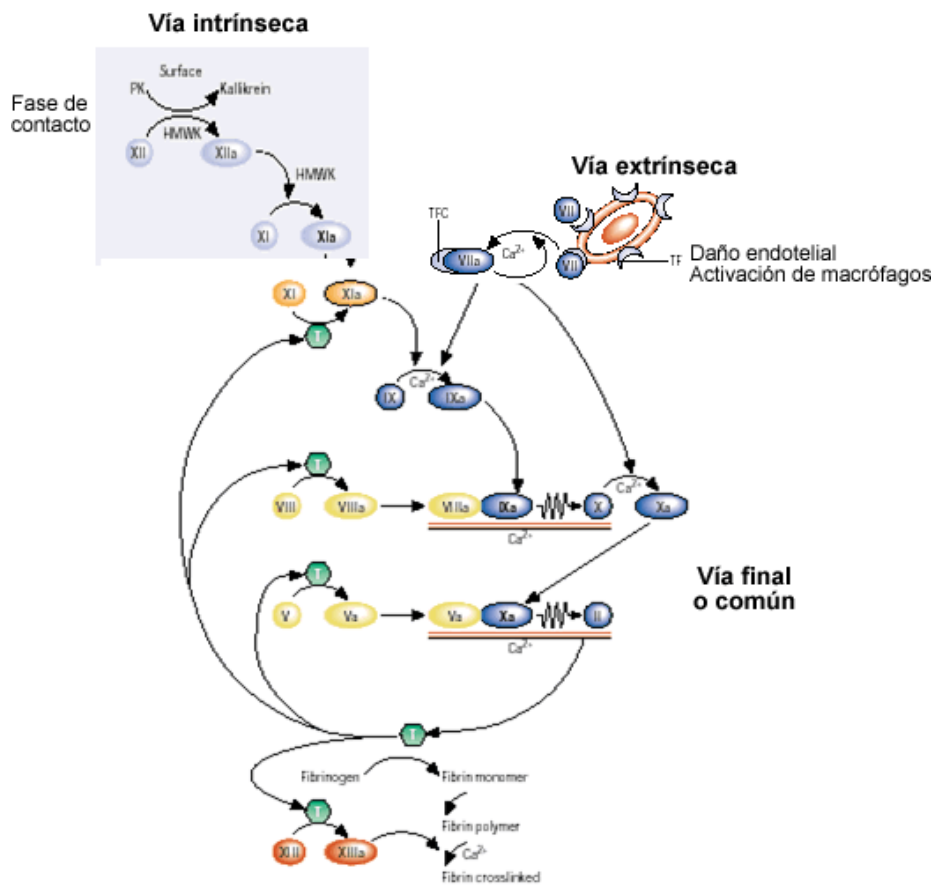


Fig 5 Sistemas intrínseco y extrínseco de la coagulación.

<http://www.quimbiotec.com/imagenes/coagulacion.gif>

#### 2.8.4.6. Respuesta inmune celular.

El paso de células inflamatorias desde el torrente vascular a la zona de la agresión es fundamental en la respuesta inflamatoria. Para ello es precisa la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y en la superficie de las células inflamatorias. En la zona de la inflamación se produce un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa y otras enzimas que tienden a incrementar la concentración intra y extracelular de radicales libres de

oxígeno, inductores de la HSR e incremento de la síntesis de HSPs en el foco inflamatorio con fines citoprotectores.

### **2.8.5. Efectos beneficiosos potenciales**

Una respuesta inflamatoria controlada y autolimitada tiene efectos beneficiosos como es la activación del sistema inmune, que incrementa la defensa frente a infecciones y potencia la cicatrización de las heridas<sup>103</sup>.

### **2.8.6. Efectos adversos potenciales**

Una respuesta inflamatoria descontrolada aumenta de forma significativa la morbimortalidad de los pacientes produciendo SIRS, incluido el síndrome de disfunción multiorgánica que aparece en sus estadios más avanzados<sup>102,103</sup>, así como una mayor susceptibilidad a infecciones especialmente por gram negativos<sup>117</sup>.

### **2.8.3. Efecto de los anestésicos en la respuesta de estrés.**

Los diferentes fármacos empleados modifican tanto la intensidad del estrés como la respuesta del organismo al mismo<sup>104</sup>, mediante sus efectos farmacológicos (sedación, hipnosis, analgesia, anestesia) y de acciones neuroinmunoendocrinas específicas<sup>98,99,104,119</sup>. Las técnicas regionales de anestesia también reducen la HSR<sup>104,120,121</sup>.

## **1. Propofol**

Reduce la intensidad del estrés por vía indirecta a través de su efecto hipnótico y sedante, y por la disminución de la síntesis de ACTH. El propofol

tiene un efecto inmunomodulador<sup>104</sup>: durante la anestesia con propofol se incrementa la síntesis de IL-1, IL-8, TNF $\alpha$  e Interferón gamma, y retrasa el incremento de IL-6<sup>104,122</sup>.

## **2. Opiáceos**

Los opiáceos también reducen el grado de estrés por su efecto analgésico y anestésico. Disminuyen la síntesis de IL-6, IL-1 y TNF $\alpha$ <sup>123,124</sup>.

## **3. Gases anestésicos**

En el caso de los gases anestésicos hay estudios contradictorios. La mayoría establecen una reducción de la respuesta a estrés<sup>98,104</sup>, hay estudios que afirman que producen una reducción en la liberación de citoquinas proinflamatorias<sup>122,123,124,125</sup>, y otros autores que durante la ventilación mecánica en animales anestesiados con halogenados se produce un aumento de la liberación de dichas citoquinas<sup>126</sup>.

## **4. Relajantes musculares**

Los relajantes musculares no parecen influir de forma importante en la respuesta a estrés<sup>98,104</sup>. No obstante, hay muy pocos estudios como para poder realizar afirmaciones seguras.

## **5. Anestesia regional**

La anestesia regional o la anestesia combinada regional y general producen un descenso en el número de complicaciones y una menor respuesta metabólica<sup>120,121,127</sup>; a pesar de ello no hay estudios definitivos

que demuestren que la anestesia regional produzca una disminución en los niveles de citoquinas proinflamatorias<sup>127-130</sup>.



## 2.9. ANESTESIA, CIRUGÍA Y HSPs

Se conoce muy poco de la relación entre la agresión quirúrgica, la anestésica y las HSPs.

En 1991 Udelsman et al<sup>131</sup> demostraron la existencia de HSR en ratas sometidas a laparotomía bajo anestesia general: objetivaron un incremento de la concentración HSPs aunque limitado a glándula suprarrenal, aorta y cava. Este incremento se produjo a los treinta minutos de haber iniciado el estímulo quirúrgico.

Años más tarde Pannen et al<sup>132</sup> demostraron que la HSR se produce durante la cirugía hepática, y que no es debida exclusivamente al daño hepático por isquemia en cerdos. Tanto Udelsman como Pannen establecen una correlación entre la respuesta neuroinmunoendocrina y la respuesta de estrés celular. Boeri et al<sup>133</sup> demostraron que la isquemia induce la síntesis de HSPs en tejido hepático humano, y que ésta se correlaciona con una mejor recuperación de la función del órgano y de los índices de hepatotoxicidad (transaminasas).

Trabajos posteriores demostraron los efectos cardioprotectores de las HSPs en la cirugía cardíaca: se producía una importante correlación negativa entre el nivel de HSPs en biopsia de tejido auricular humano, el daño isquémico postcirugía<sup>134</sup> y la aparición de complicaciones<sup>135</sup>. Se ha objetivado igualmente la capacidad protectora de las HSPs en miocitos<sup>136,137</sup> y plasma<sup>138</sup> frente al daño de isquemia-reperfusión tras by-pass coronario<sup>136,137,138</sup> o en la supervivencia de los injertos coronarios<sup>139</sup>.

Otros estudios contradicen estos hallazgos<sup>140,141</sup>. La explicación puede estar en las condiciones de la cirugía, en la utilización de soluciones cardioplégicas y la hipotermia. La elevación de las HSPs en tejido miocárdico durante la cirugía cardiaca permanece sin confirmar y son necesarios estudios más amplios que la confirmen.

Se han realizado estudios sobre la implicación de las HSPs en el trasplante pulmonar<sup>142</sup> y de miocitos aislados<sup>143</sup> en modelos animales. En ellos se demuestra que la inducción de la HSR en el injerto protege frente al daño por isquemia.

Algunos autores han utilizado las HSPs 70 y 65 para estudiar la toxicidad del sevoflurano en ratones expuestos a dosis altas y repetidas de gas anestésico; sin embargo no se pudo demostrar elevación de HSPs como respuesta al gas anestésico<sup>144</sup>. Los estudios sobre la interacción de las HSPs con los fármacos anestésicos son aún escasos, y motivo de investigaciones ulteriores.

## 2.10. HSPs Y CÁNCER DE PULMÓN

Hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio que evalúe la situación basal de las HSPs en los pacientes afectados de hernia inguinal, de manera que como premisa de partida hemos asumido que éstas deben ser similares a las que presenten los pacientes sanos.

Por el contrario, los pacientes sometidos a toracotomía presentan todos ellos una patología de base grave (cáncer de pulmón), que pueden condicionar la respuesta de estrés celular.

Diversos estudios demuestran un aumento de la síntesis de HSPs70, HSPs60<sup>145</sup>, HSPs40<sup>146</sup> y anticuerpos antiHSPs 90,70 y 40<sup>146,147</sup>; en el caso de las HSPs de bajo peso molecular (HSP27 y ubiquitina) los estudios son contradictorios afirmando la existencia tanto de un incremento<sup>148</sup> como su ausencia<sup>145</sup>.

Este incremento en la producción de HSPs puede tener importantes implicaciones diagnósticas, pronósticas<sup>149</sup> y terapéuticas<sup>150</sup> en oncología.





































Caso	Edad	Antecedentes quirúrgicos	Antecedentes médicos	Tratamiento habitual	Cirugía	Diagnóstico	Evolución
HT1	77	Hernia discal. Fractura de fémur (enclavado gamma) Hiperplasia benigna de próstata (R.T.U.) Cataratas	Hernia de hiato H.T.A. D.M.I.D. Hipercolesterolemia Cardiopatía isquémica Polimialgia reumática. E.P.O.C. Tabaquismo	Deflazacort Atorvastatina A.A.S. Insulina Terbutalina Bromuro de ipatropio Pantoprazol	Resección en cuña de una masa en L.S.I.	Carcinoma epidermoide	Recidiva tumoral. Precisa tratamiento quimioterápico.
HT2	51	Vasculopatía periférica (bypass femoro-femoral)	H.T.A. D.M.N.I.D. Hipercolesterolemia Cardiopatía isquémica (I.A.M.) Obesidad Tabaquismo	A.A.S. Atorvastatina	Resección en cuña de una masa en L.S.D.	Adenocarcinoma	Buena evolución
HT3	68	Neumotórax izquierdo	Tabaquismo	Ninguna	Lobectomía superior derecha	Carcinoma epidermoide	Buena evolución
HT4	36	Ginecomastia	Ninguna	Ninguna	Resección de lesión sospechosa	Tuberculoma	Buena evolución
HT5	66	Ninguna	Colitis ulcerosa. A.C.V.A. E.P.O.C. Tabaquismo	A.A.S. Nimodipino Mesalazina	Lobectomía inferior izquierda	Carcinoma epidermoide	Atelectasia pulmón izquierdo. TEP. Insuficiencia respiratoria. Ventilación asistida 3 semanas. Miocardiopatía perioperatoria. Al año: tumor en remisión.
HT6	43	Mediastinoscopia Uropatía obstructiva	Tabaquismo Quimioterapia preoperatoria	Ninguna	Neumonectomía, parietectomía. Tiempo quirúrgico 12 horas	Carcinoma epidermoide localmente extendido	Precisa transfusión. Buena evolución
HT7	63	Peritonitis	Carcinoma basocelular de nariz. Tabaquismo	Ninguna	Lobectomía inferior izquierda	Carcinoma epidermoide	Buena evolución
HT8	76	Ninguna	DMNID Tabaquismo	Antidiabéticos	lobectomía inferior izquierda.	Carcinoma epidermoide	Buena evolución

<b>HT9</b>	75	Ninguna	H.T.A. D.M.N.I.D. E.P.O.C. A.C.V.A. tabaquismo	Antidiabéticos antihipertensivos	Resección de tumor paravertebral	Hamartoma pulmonar	síndrome febril postoperatorio fallece a los 2 meses por hemorragia intracraneal
<b>HT10</b>	58	Amigdalectomía Fractura de calcáneo (bilateral).	Cáncer de laringe extendido; tratamiento con quicio y radioterapia. tabaquismo	Fluoxetina Benzodiacepinas haloperidol	Lobectomía superior derecha	Carcinoma epidermoide (2º primario)	Atelectasia de pulmón derecho Infección por Aspergillus. Al año: remisión completa.
<b>HT11</b>	79	Estenosis aórtica (prótesis aórtica)	Estenosis tricuspídea. Mala función ventricular E.P.O.C. Tabaquismo	Dicumarínicos	Lobectomía superior derecha	Carcinoma epidermoide	Atelectasia derecha. Fallo multiorgánico Fallece a los 3 meses

*Tabla 8 Características clínicas de los pacientes sometidos a toracotomía. Abreviaturas: D.M.I.D. Diabetes mellitus insulín dependiente. D.M.N.I.D. Diabetes mellitus no insulín dependiente. A.C.V.A. accidente cerebro vascular agudo. L.S.D. Lóbulo superior derecho. L.S.I. Lóbulo superior izquierdo. T.E.P: Tromboembolismo pulmonar.*

	PREOPERATORIO	POSTOPERATORIO
<b>Hemoglobina*</b> (g/dl)	14,6±0,9	11,5±1,4
<b>Glucemia</b> (mg/dl)	129±50	122±25
<b>Urea*</b> (mg/dl)	42±18	32±17
<b>Creatinina*</b> (mg/dl)	1.02±0,42	0,93±0,45
<b>AST*</b> (UI/dl)	20±12	76±58
<b>Sodio</b> (Meq/l)	137±2,5	139±2,1
<b>Potasio</b> (Meq/l)	4,0±0,2	3,7±0,7

*Tabla 9. Comparación de los valores analíticos pre y postoperatorios en pacientes sometidos a toracotomías. (\* diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación típica.*

## 5.2. HSPs

No se aprecian diferencias significativas en los niveles de HSPs70 entre los dos grupos antes de la cirugía, ni entre los dos grupos de estudio y el grupo control. (fig 6 y tabla 10). Existe un nivel aparentemente menor de HSPs70c basal en el grupo de pacientes sometidos a toracotomía, aunque sin llegar al nivel de significación estadística ( $p=0,116$ ).

En el postoperatorio inmediato, tanto HSP70c como HSP70i presentan niveles aparentemente inferiores a los del preoperatorio en los pacientes toracotomizados con respecto a los valores preoperatorios, sin alcanzar significación estadística (fig 7 y tabla 11).

La HSP70 constitutiva experimenta un descenso no significativo en el postoperatorio en ambos grupos. En el caso de la HSP70 inducible se produce un ligero ascenso en el grupo de pacientes sometidos a herniorrafia con respecto a valores previos y un descenso con respecto a los valores preoperatorios que roza la significación estadística en el grupo de pacientes sometidos a toracotomía ( $p=0,068$ ). Si analizamos los dos grupos como conjunto también se produce un descenso que en el caso de las HSP70 constitutivas está cercano a la significación estadística ( $p=0,091$ ). (figs 8 y 9).

En las figuras 10 a 13 se muestra el análisis de las HSPs70 caso por caso. En el 50% de las herniorrafias y en el 55% de las toracotomías se produce un descenso en las HSPs en el postoperatorio. En los casos HH2, HT4, HT5, HT6 y HT10 este descenso es muy llamativo. También destacaremos los casos HH7 en el que se produce un aumento muy marcado de HSPs70 en el postoperatorio y el caso HH9 que presenta unos niveles de HSPs70i casi indetectables de forma constitutiva. El paciente HH10 presenta

un descenso en su niveles de HSPs70 constitutiva e inducible, aunque no tan marcado como en los casos anteriores. Los enfermos HH3 y HH4 presentan un descenso ligero exclusivamente en las HSPs70 constitutivas.

Los cinco pacientes en los que se demuestra un descenso en las HSPs70 en el postoperatorio inmediato, presentan en sus antecedentes patologías que provocan cuadros inflamatorios crónicos: HH2: pancreatitis crónica ,HT4: tuberculosis, HT5: colitis ulcerosa, HT6: quimioterapia, HT10: quimioterapia y radioterapia. En ningún otro caso se presentaron antecedentes similares.

Los pacientes HH4, HH7, HH9 y HH10 no tienen antecedentes patológicos de interés, que pudieran interferir con la síntesis basal o postoperatoria de HSPs70.

Los casos HH2, HT5, HT6, y HT10, presentaron los descensos más importante de HSPs70 en el postoperatorio y eran fumadores activos. No hay asociación entre el antecedente de tabaquismo o alcoholismo y los pacientes que presentaron descensos en las HSPs. HH2 presentaba alcoholismo y tabaquismo, HT5, HT6 y HT10 eran fumadores y HT4, HH7 y HH9 no referían hábitos tóxicos.

Respecto a la evolución, los casos HH2, HH7, HH9, HT4 y HT10 tuvieron un postoperatorio sin complicaciones. HT5 presentó una evolución tórpida con múltiples complicaciones y HT6 precisó una transfusión en el postoperatorio. Los casos HT9 y HT11, ambos fallecidos en el postoperatorio tardío, debido a una hemorragia intracraneal y a un síndrome de disfunción multiorgánica respectivamente, no presentaron modificaciones importantes en las HSPs.



### HSP70 preoperatoria

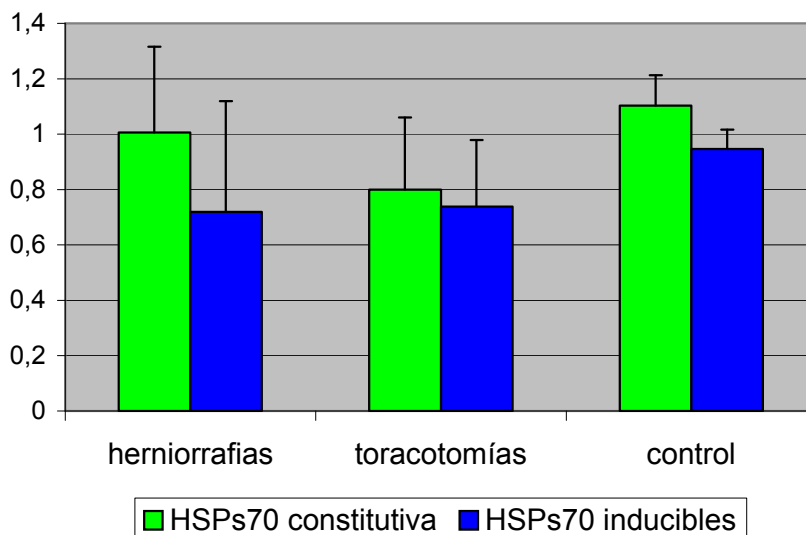


Fig 6 HSPs70 en el preoperatorio. En verde se pueden ver las HSPs70 constitutivas y en azul las inducibles. La diferencia que se aprecia entre el grupo de herniorrafias y el de toracotomías no es estadísticamente significativa. Las unidades reflejan la proporción entre el valor medido y un patrón de referencia que consideramos como la unidad por lo que son adimensionales.

	HERNIORRAFIA	TORACOTOMÍA	CONTROL
<b>HSP70 constitutiva</b>	1,01±0,31	0,8±0,26	1,10±0,11
HSP70 inducible	0,72±0,4	0,74±0,24	0,95±0,07

Tabla 10. HSPs70 preoperatorias, valores numéricos expresados como media ± desviación típica.

### HSP70 postoperatorio

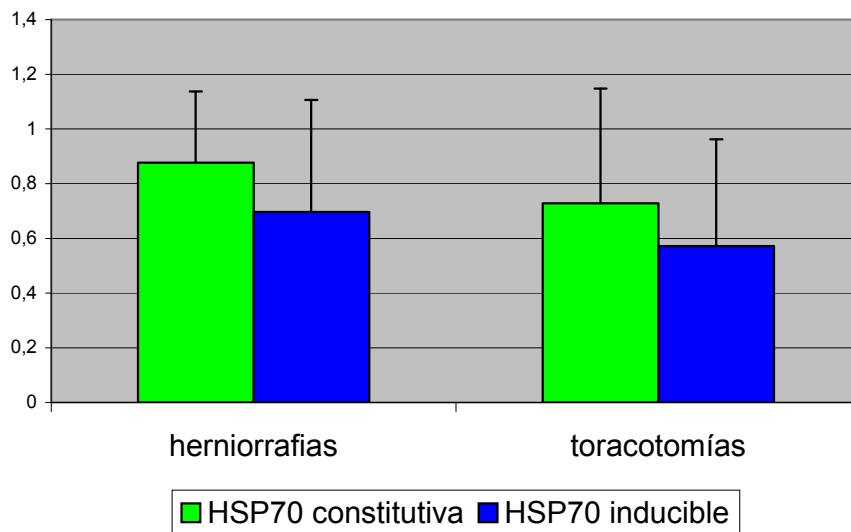


Fig 7 HSPs70 en el postoperatorio. En verde se pueden ver las HSPs70 constitutivas y en azul las inducibles. La diferencia que se aprecia entre el grupo de herniorrafias y el de toracotomías no es estadísticamente significativa.

	HERNIORRAFIA	TORACOTOMÍA
HSP70 constitutiva	0,88 ± 0,26	0,70 ± 0,42
HSP70 inducible	0,73 ± 0,41	0,57 ± 0,39

Tabla 11. HSPs70 postoperatorias, valores numéricos expresados como media ± desviación típica.

### HSP70 constitutiva

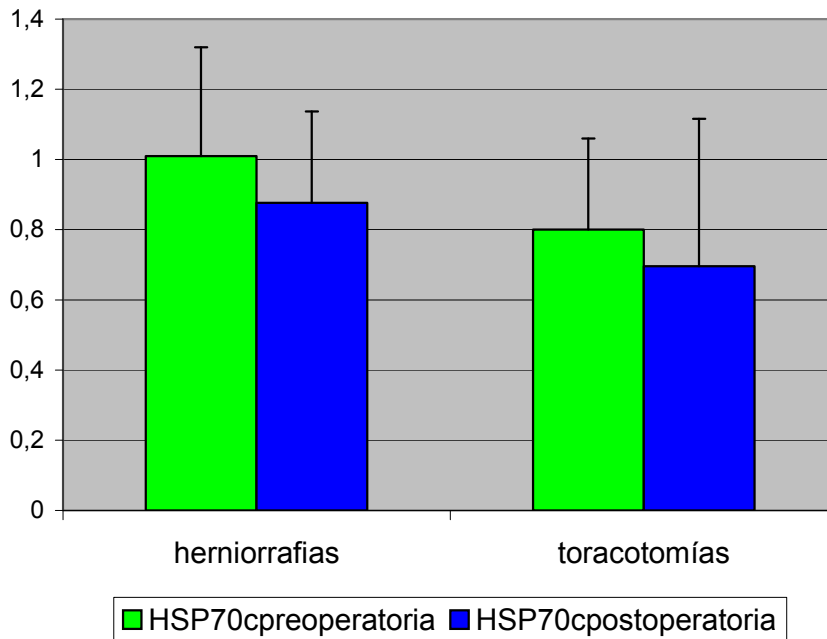


Fig 8 HSPs70 constitutiva pre (color verde) y postoperatorias (color azul).

	HERNIORRAFIA	TORACOTOMÍA
HSP70c preoperatoria	1,01± 0,31	0,8 ± 0,26
HSP70c postoperatoria	0,88± 0,26	0,70 ± 0,42

Tabla 12. HSP70 constitutiva pre y postoperatoria, valores numéricos expresados como media ± desviación típica.

### HSP70 inducible

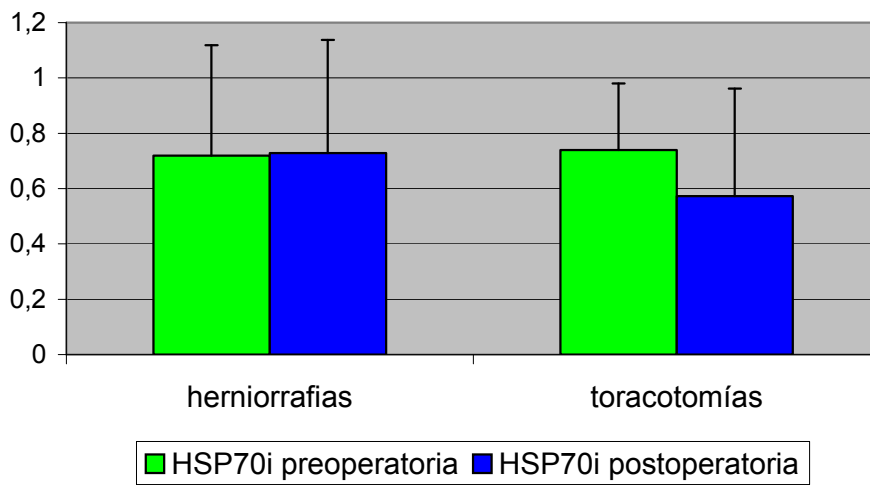


Fig 9 HSPs70 inducible pre (color verde) y postoperatorias (color azul).

	HERNIORRAFIA	TORACOTOMÍA
HSP70i preoperatoria	0,719 ± 0,4	0,74 ± 0,24
HSP70i postoperatoria	0,728 ± 0,41	0,572 ± 0,39

Tabla 13. HSP70 inducible pre y postoperatoria, valores numéricos expresados como media ± desviación típica.

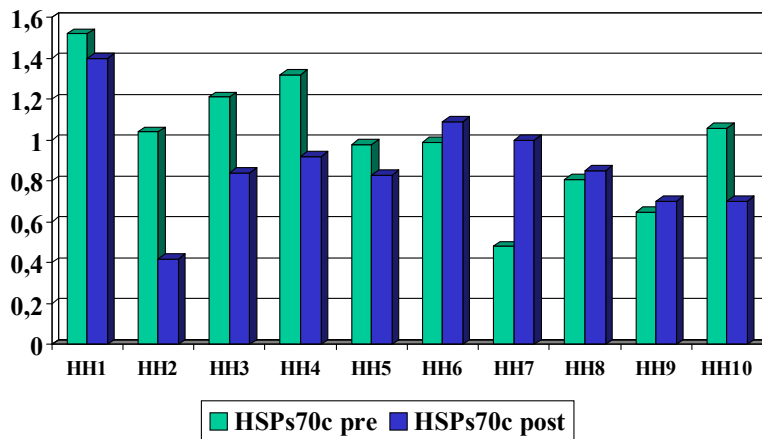


Fig 10 Niveles de HSPs70 constitutiva en el grupo de herniorrafias caso por caso. En verde se representan los valores preoperatorios y en azul los postoperatorios.

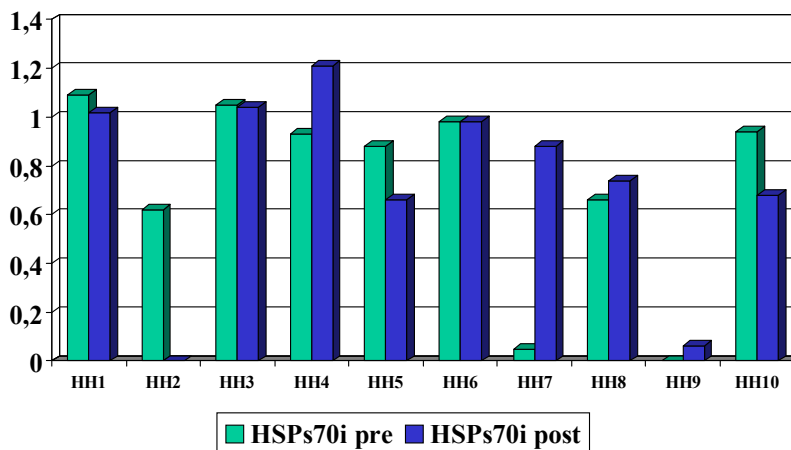


Fig 11 Niveles de HSPs70 inducibles en el grupo de herniorrafias caso por caso. En verde se representan los valores preoperatorios y en azul los postoperatorios.

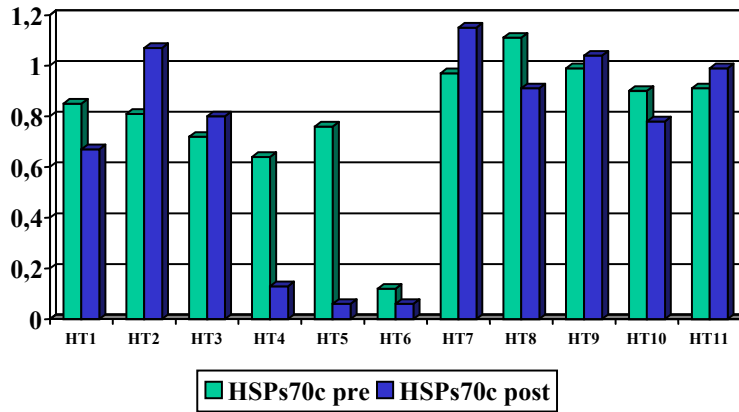


Fig 12 Niveles de HSPs70constitutivas pre (color verde) y postoperatorias (color azul) caso por caso en el grupo de toracotomías.

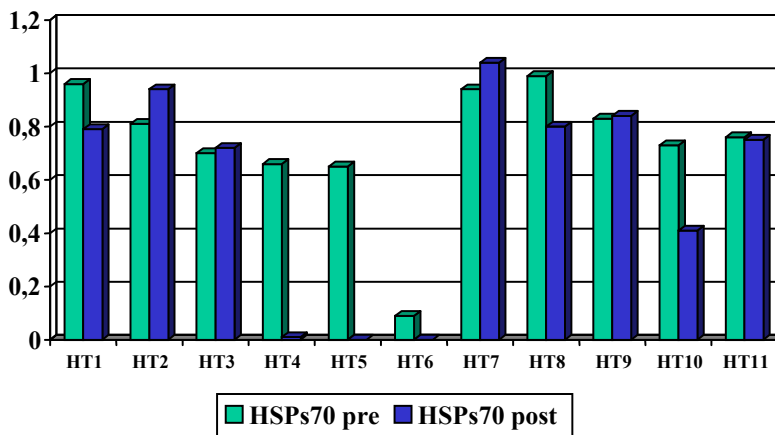


fig 13 Niveles de HSPs70 constitutivas pre (color verde) y postoperatorias (color azul) caso por caso en el grupo de toracotomías

### 5.3. Anticuerpos anti-HSPs70.

Existe un descenso estadísticamente significativo del nivel de anticuerpos antiHSP70i en el postoperatorio en los pacientes sometidos a toracotomía ( $p=0,008$ ). Por el contrario, en los pacientes intervenidos de herniorrafia, los niveles de anticuerpos se mantienen estables (fig 14 y tabla 7) después de la intervención.

Si analizamos los resultados de forma individual (figs 15-16) podemos destacar que el paciente HH2 que presenta unos niveles de anticuerpos significativamente más bajos que el grupo control ( $p<0,001$ ) en el preoperatorio, los incrementa de forma significativa en el postoperatorio (250%). Los casos HH3, HH4, HH7 y HH9, que presentaban niveles reducidos de HSPs70, no experimentaron variaciones significativas en sus niveles de anticuerpos.

En los pacientes sometidos a toracotomía llama la atención el comportamiento del paciente HT3 que presenta un descenso muy llamativo en su nivel de anticuerpos; no presentó ningún cambio importante en sus niveles de HSPs ni ningún antecedente llamativo. Los pacientes HT4, HT5 y HT6 tienen los niveles más elevados de antiHSPs en el preoperatorio. En el postoperatorio experimentan un descenso importante, más llamativo en el caso HT6, (el que menores niveles presenta constitutivamente de HSPs70). El paciente HT10 experimentó también un descenso marcado de antiHSPs70 aunque sus niveles preoperatorios no eran tan elevados.

Por último, mencionar los casos HT9 y HT11 (que fallecieron en el postoperatorio tardío) que presentan un descenso moderado en sus niveles de antiHSPs70i.

### Anticuerpos antiHSPs70i

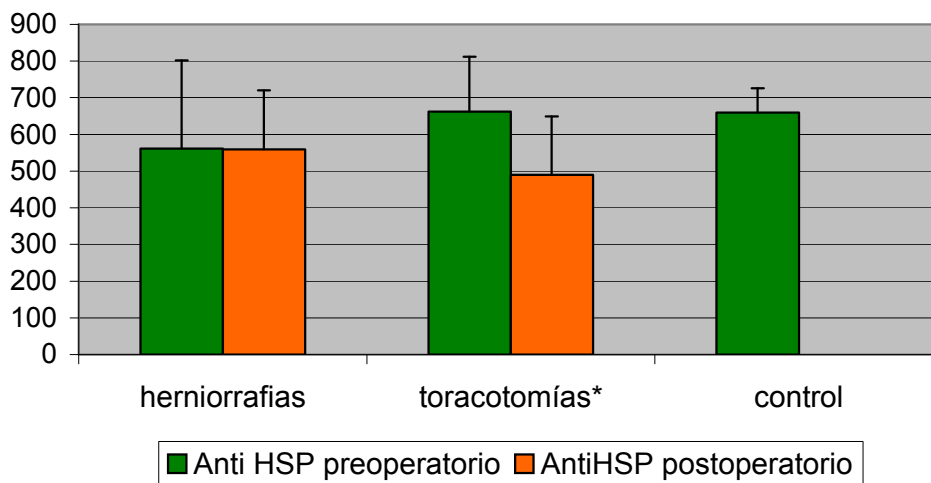


Fig 14 anticuerpos antiHSPs representados en  $\mu\text{g/ml}$ . En verde se representan los valores preoperatorios y en naranja los postoperatorios. En el grupo de toracotomías se aprecia un descenso estadísticamente significativo  $p < 0,05$ .

	HERNIORRAFIA	TORACOTOMÍA	CONTROL
Anti HSP70 preoperatorio	561 ± 241	662 ± 150	660 ± 66
Anti HSP70 postoperatorio	559 ± 161	490 ± 159	

Tabla 13. anticuerpos antiHSPs pre y postoperatorios, valores numéricos expresados como media  $\pm$  desviación típica. Expresada como  $\mu\text{g/ml}$



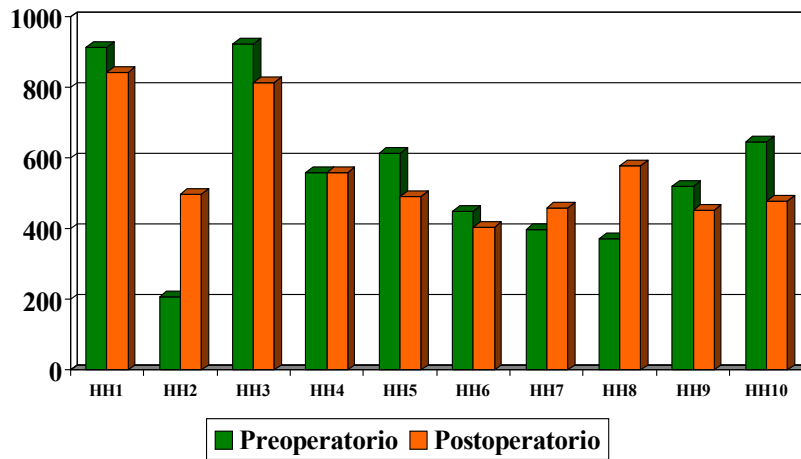


Fig 15 Anticuerpos antiHSPs70i representados en  $\mu\text{g/ml}$  en el grupo de herniorrafias caso por caso. En verde se representan los valores preoperatorios y en naranja los postoperatorios.

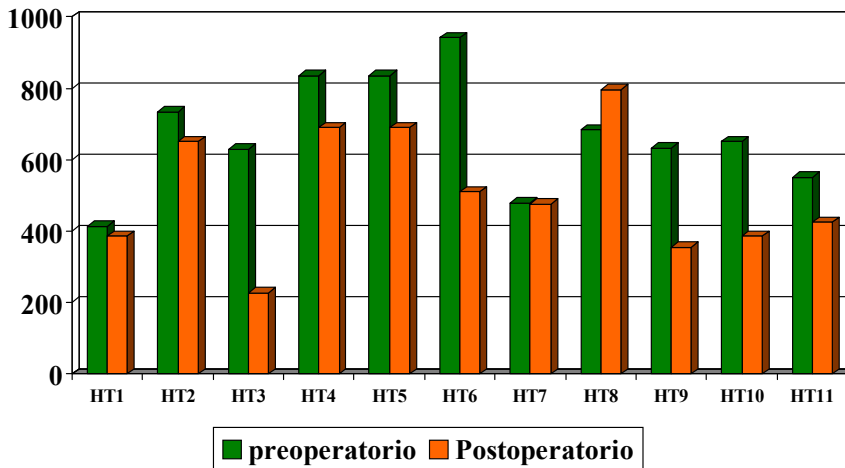


Fig 16 Anticuerpos antiHSPs70i representados en  $\mu\text{g/ml}$  en el grupo de toracotomías caso por caso. En verde se representan los valores preoperatorios y en naranja los postoperatorios.

#### 5.4. Interleuquina 6 (IL-6)

El análisis de interleuquina 6 revela un ascenso significativo de las mismas en el postoperatorio en ambos grupos. ( $p=0,012$  en el grupo de pacientes sometidos a herniorrafia y  $p=0,016$  en el grupo de toracotomizados). No existen diferencias significativas entre los dos grupos. (fig 17 y tabla 14). Dado que la IL-6 no se ajusta a la distribución normal se empleó el test de Wilcoxon en vez de la prueba t de student para su análisis estadístico.

Si analizamos de forma individual (figs 18 y 19) podemos ver que en la mayoría de los casos la IL6 es indetectable o menor de 1 picogramo/ml en el preoperatorio. Sin embargo hay 3 casos en los que la IL6 preoperatoria está muy elevada HH8, HH10 y HT2. En estos tres casos se produce también un ascenso marcado en el postoperatorio. HH8 presenta una polimialgia reumática, HT2 es un paciente hipertenso y con cardiopatía isquémica por arterioesclerosis; ambas patologías pueden justificar el ascenso de IL-6. En el caso de HH8 no se detectó ninguna patología intercurrente; aunque no se puede descartar la presencia de alguna enfermedad inflamatoria que cursara de forma asintomática o paucisintomática. Ninguno de los tres presenta un descenso en sus niveles de HSPs70 ó antiHSPs70. Tampoco existe ningún antecedente que pueda explicar esta situación.

Los pacientes HT4, HT5, HT6 y HT8 presentaron un ascenso por debajo de la media, lo que no ocurrió en HH2, HH3, HH4, HH7 y HT10. Destaca el paciente HH9, cuya IL6 era indetectable tanto pre como postoperatoria.

El caso HT2 es el único que presenta un descenso de IL6 en el postoperatorio. Su evolución postoperatoria fue satisfactoria, sin ningún tipo de complicación.

### Interleuquina 6

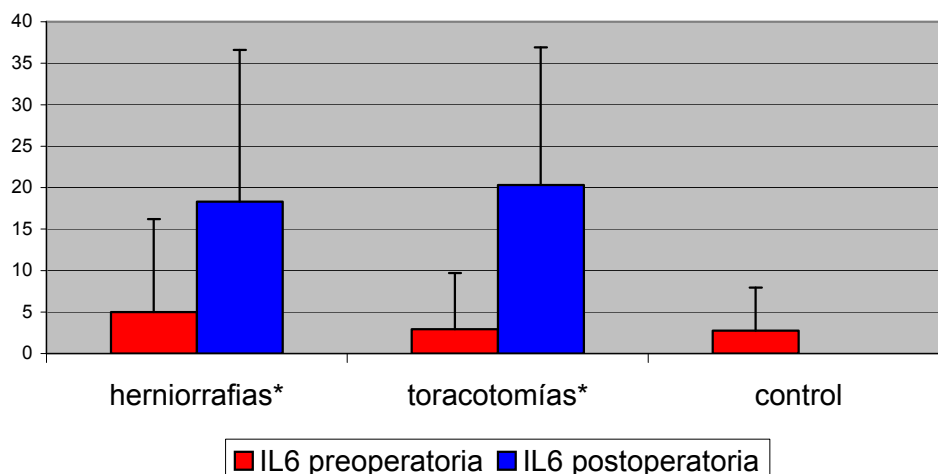


Fig 17 Niveles de IL6 pre (color rojo) y postoperatorios expresados en picogramos por mililitro. El ascenso es estadísticamente significativo en ambos grupos. (los valores marcados con \* presentan un ascenso significativo  $p < 0,001$ )

	HERNIORRAFIA	TORACOTOMÍA	CONTROL
IL6 preoperatoria	4,99 ± 11,2 pg/ml	2,91 ± 6,8 pg/ml	2,74 ± 5,2 pg/ml
IL6 postoperatoria	18,3 ± 18,3 pg/ml	20,03 ± 16,6 pg/ml	

Tabla 14. Interleuquina 6 pre y postoperatoria expresados en picogramos por mililitro, valores numéricos expresados como media ± desviación típica.

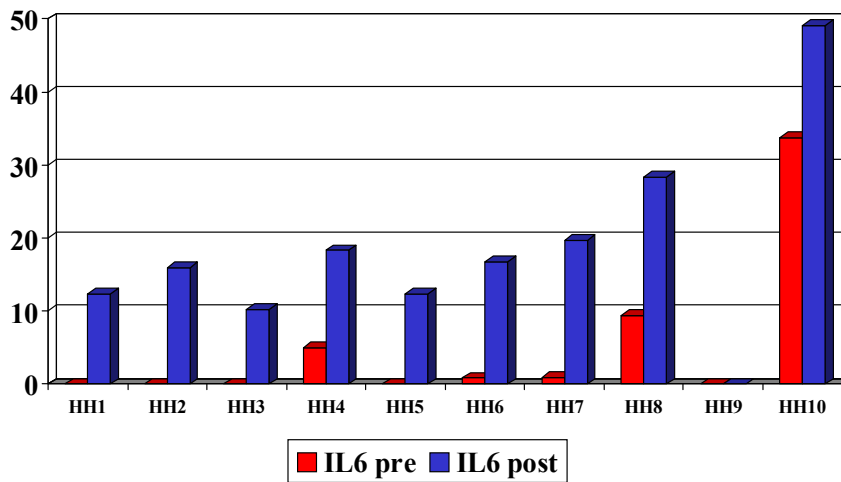


Fig 18 Niveles de IL6 en el grupo de herniorrafias caso por caso expresados en picogramos por mililitro. En rojo se representan los valores preoperatorios y en azul los postoperatorios.

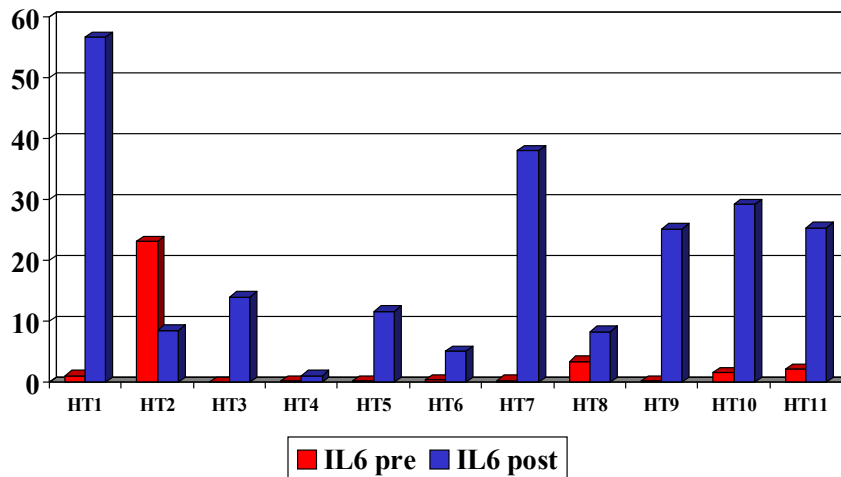


Fig 19 Niveles de IL6 en el grupo de toracotomías caso por caso expresados en picogramos por mililitro. En rojo se representan los valores preoperatorios y en azul los postoperatorios.

## 5.5. Correlaciones

Se intentaron establecer correlaciones entre los niveles de HSPs70, antiHSPs70i e IL6. No ha podido demostrarse ninguna correlación estadísticamente significativa. Tan sólo merece la pena destacar la relación entre el nivel de anticuerpos pre y postoperatorio y la IL6 en el postoperatorio. Presentan un coeficiente de correlación de Pearson de -0,419 para los anticuerpos preoperatorios ( $p=0,066$ ) y un coeficiente de -0,395 para los anticuerpos postoperatorios ( $p=0,085$ ).

También existe fuerte correlación entre las HSPs70 constitutiva e inducibles pre y postoperatorias por un lado y una moderada correlación entre los anticuerpos pre y postoperatorios (tabla 15). No se aprecia correlación entre IL6 pre y postoperatoria.

	HSPs70cPRE HSPs70cPOST	HSPs70cPRE HSPs70iPRE	HSPs70cPRE HSPs70iPOST	HSPs70iPRE HSPs70cPOST	HSPs70iPRE HSPs70iPOST	HSPs70cPOST HSPs70iiPOST	ANTIHSPsPRE ANTIHSPsPOST
<b>Coeficiente de correlación de PEARSON</b>	0,59	0,82	0,58	0,44	0,6	0,86	0,53

*Tabla 15 Correlación entre las HSPs70 y entre los niveles de anticuerpos pre y postoperatorios. Sólo se representan los valores estadísticamente significativos.*

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Características de la muestra

En el estudio se incluyeron 21 pacientes intervenidos en un hospital terciario de referencia y 6 donantes voluntarios sanos.

Muchos de los pacientes presentan patología médica y quirúrgica asociada (tablas 8 y 9), lo cual es habitual tanto en la muestra estudiada como en la población general en su mismo rango de edad.

Existe homogeneidad en las características antropométricas y en los valores analíticos preoperatorios, pero existen diferencias significativas entre los grupos en el consumo de tabaco. En el grupo de pacientes sometidos a herniorrafia el 30% se confesó fumador durante la entrevista clínica. En los pacientes toracotomizados el porcentaje fue del 91%. Esta diferencia es significativa ( $p < 0.01$ ) aunque simplemente refleja un hecho sobradamente conocido, como es la relación entre tabaco y cáncer de pulmón<sup>154</sup>.

Dado que el tabaco es un agente estresante potencialmente capaz de inducir respuestas de estrés celular<sup>155</sup>, esta asociación podría afectar, teóricamente, a los resultados del estudio.

En el grupo de pacientes toracotomizados se obtuvo un estudio bioquímico de control a las 24 horas del inicio de la agresión anestésico quirúrgica. Las diferencias entre el pre y el postoperatorio se deben a la intensidad de la agresión quirúrgica (descenso de la hemoglobina, ascenso de la AST), y al tratamiento médico postoperatorio, especialmente en el manejo de líquidos (descenso de urea y creatinina). Estos cambios no deberían influir en los resultados de los objetivos planteados en este estudio ya que son

consecuencia de un manejo médico protocolizado y común a todos los pacientes intervenidos.



## 6.2. HSPs

Al analizar la expresión de las HSPs70 observamos una tendencia no significativa al descenso a las 24 horas del inicio de la intervención en ambos grupos muy próxima al nivel de significación estadística. Esta reducción se produce tanto en las HSPs70 constitutivas como en las inducibles, y es más relevante en los pacientes toracotomizados. Dicha se vio en un estudio analizando el efecto de la artroplastia de rodilla sobre las HSPs<sup>156</sup>.

Este hallazgo parece contradictorio con la HSR; dado que la agresión quirúrgica es un estrés importante para el organismo, sería razonable esperar una respuesta de estrés celular con aumento de la expresión de las HSPs. Sin embargo éste no se produce. Este fenómeno puede justificarse por varias razones.

En primer lugar puede deberse a que no se produzca incremento de HSPs70 en ningún momento, lo que sugeriría que la agresión quirúrgica y anestésica no es inductora de HSR. Esta observación contradice otros trabajos publicados en los que experimentos con diferentes modelos animales demuestran una inducción de HSPs70 durante y después de la cirugía<sup>131-133</sup>, lo que sugiere que la cirugía y la anestesia serían estímulos capaces de inducir estrés celular. Por otra parte, tanto en las herniorrafias como en los pacientes toracotomizados se produce un aumento de la IL-6 a las 24 horas del inicio de la agresión anestésico quirúrgica, lo cual apunta a que se produce respuesta neuroinmunoendocrina a nivel sistémico, confirmando que el estímulo quirúrgico y anestésico sí supone un estrés importante para el organismo.

Una segunda explicación sería la siguiente: las muestras se tomaron a las 24 horas de la cirugía, por lo cual se puede hipotetizar que el estímulo quirúrgico produzca una respuesta de estrés celular severa en las primeras horas del postoperatorio con agotamiento posterior de la misma, lo que implicaría una respuesta bifásica, con un ascenso inicial seguido por un descenso que es el objetivado en este estudio. La secuencia fisiológica podría ser la siguiente: la cirugía y la anestesia producirían una situación de estrés severo en el organismo, tanto a nivel local como sistémico. Ello originaría una HSR inmediata de gran intensidad, lo que a su vez produciría una respuesta del sistema inmune orientada a controlar esta respuesta. Esta respuesta inmune podría ser humoral (autoanticuerpos) y celular (posiblemente mediada por linfocitos  $\gamma/\delta$ )<sup>74</sup>, cuya función sería la de eliminar las células sometidas a estrés y cuya viabilidad no sea posible. De esta forma los anticuerpos tenderían a concentrarse en la zona de la agresión quirúrgica de manera que sus niveles plasmáticos descenderían.

Diversos estudios relacionan las HSPs con la regulación de la apoptosis en numerosas especies celulares, incluidos los PMNs, sin embargo sus conclusiones son contradictorias afirmando unos que las HSPs aumentan la tasa de apoptosis<sup>94,95</sup> y otros que la reducen<sup>96,97</sup>. Esta aparente contradicción podría deberse al hecho de que las células sometidas a un estrés más intenso son las que sintetizan mayor cantidad de HSPs. Los PMNs son células que sufren una agresión intensa, con gran daño de su maquinaria proteica; son por tanto células con riesgo de sufrir un daño irreparable, a pesar de la función protectora del incremento en las HSPs sintetizadas. Si el daño de las proteínas celulares supera la capacidad de regeneración y eliminación que producen las

HSPs, la célula sería eliminada tanto mediante apoptosis<sup>94-97</sup> como por mecanismos inmunológicos de control mediados por anticuerpos antiHSPs y linfocitos natural killer<sup>74,76,77,79</sup>. De acuerdo con esto las HSPs serían protectoras frente a la apoptosis en células con un alto nivel de daño, y por tanto con importante predisposición a ser eliminadas.

El análisis de los dos grupos de estudio demuestra diferencias en el comportamiento de las HSPs70i. En los pacientes toracotomizados se produce un descenso importante de las mismas a las 24 horas del postoperatorio, mientras que en el grupo de pacientes sometidos a herniorrafias este descenso no se produce. En el caso de las HSPs70c se aprecia un descenso similar en ambos grupos. Este comportamiento diferencial puede ser debido al diferente grado de estrés anestésico-quirúrgico al que fueron sometidos los enfermos, lo que confirmaría la segunda hipótesis.

Cuando se analizan los casos uno a uno se pueden extraer más consecuencias. Se ve que existe una gran variabilidad interindividual que podría ser otra explicación para los resultados obtenidos<sup>157</sup>. Este fenómeno puede deberse a polimorfismos genéticos de la región reguladora del gen *hsp70i*<sup>157</sup> que condicionarían la capacidad de transcripción en mRNAs y por tanto de síntesis de proteínas.

Los casos HH7 y HH9 presentan niveles muy bajos de HSP70i de forma basal. En el primero de los pacientes se produce un ascenso en el postoperatorio hasta niveles normales. En el caso HH9 los niveles de HSPs permanecen bajos tanto antes como después de la intervención. HH7 tenía como principal antecedente la cardiopatía isquémica<sup>158</sup>, como consecuencia de la misma tomaba ácido acetil salicílico. Los AINEs en principio aumentan la













## 6.5. Perspectivas de futuro

El conocimiento preciso de la fisiología de la HSR es importante puesto que su eventual manipulación podría aportar beneficios terapéuticos.

La modificación de la respuesta puede ser tanto en el sentido de su regulación al alza como su regulación a la baja. En el momento actual se desconoce cual de las dos opciones sería más conveniente en la agresión quirúrgica, aunque se sospecha que su regulación al alza podría ser positiva al disminuir la repercusión de la agresión anestésico-quirúrgica sobre la fisiología celular.

Una de las opciones más ampliamente empleadas en el momento actual para incrementar la HSR es la utilización del preconditionamiento isquémico. Es decir provocar la estimulación de la síntesis de HSPs y otras moléculas citoprotectoras antes de la agresión anestésica y quirúrgica severa para intentar disminuir las lesiones tisulares.

Se ha demostrado que el preconditionamiento isquémico del intestino reduce la respuesta inflamatoria sistémica al shock hemorrágico en un modelo experimental con ratas<sup>159</sup>. También se ha observado que el incremento de HSPs en miocardio de conejos es protector frente a la isquemia cardiaca<sup>158</sup>. Los mecanismos de acción implican no sólo a las HSPs sino, probablemente, a algunas otras proteínas citoprotectoras como la sintetasa de óxido nítrico y las enzimas antioxidantes<sup>156</sup>.

De los resultados de estos trabajos se puede concluir que el incremento de la síntesis de HSPs y otras enzimas citoprotectoras puede ser útil para reducir la respuesta de estrés frente a la agresión quirúrgica, especialmente si









## 7. CONCLUSIONES

1. La expresión basal de HSPs en PMNs presenta grandes diferencias interindividuales, que condicionan su posterior inducibilidad.
2. A las 24 horas del postoperatorio se produce un descenso en la concentración intraleucocitaria de HSPs70, en ambos tipos de estrés, quirúrgico y anestésico, que no alcanza el nivel de significación estadística.
3. A las 24 horas del postoperatorio se produce un descenso significativo en los niveles de anticuerpos anti-HSPs70, en los dos tipos de estrés quirúrgico y anestésico..
4. En el postoperatorio se produce un ascenso significativo de interleucinas 6, en los dos grupos estudiados.
5. Existe correlación negativa significativa entre los niveles de interleucinas y niveles de anticuerpos anti HSPs.
6. La agresión anestésico quirúrgica intensa produce un descenso aparentemente menor de HSPs70i y anticuerpos anti HSPs70i que en pacientes sometidos a un estrés de menor intensidad.

## 8. Bibliografía

1. Lindquist S (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151-1191.
2. Curtis H, Barnes NS (1985). *Invitación a la biología* (4ª ed). Panamericana. Madrid.
3. Hensler T, Köller M, Alouf JE (1991). Bacterial toxins induce heat shock proteins in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 872-879.
4. Witko-Sarsta V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80: 617-652.
5. Morimoto RI, Sargog KD, Abravaya K (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. *J Biol Chem* 267: 21987-21990.
6. Silver PA, Way JC (1993). Eukariotic DnaJ homologs and the specificity of HSP70 activity. *Cell* 74: 5-6.
7. Williams RS, Thomas JA, Fina M, German Z, Benjamin IJ (1993). Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress. *J Clin Invest* 92: 503-508.
8. Polla BS, Bachelet M, Elia G, Santoro MG (1998). Stress proteins in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 851: 75-85.
9. Amici C, Giorgi C, Rossi A, Santoro MG (1994). Selective inhibition of virus protein synthesis by prostaglandin A: a translational block associated with HSP 70 synthesis. *J Virol* 68: 6890-6899.
10. Mestriil R, Chi SH, Sayen MR, O'Reilly K, Dillmann WH (1994). Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against stimulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest* 93: 759-767.
11. Lavoine JN, Hickey E, Weber LA, Landry J (1993). Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268: 24210-24214.
12. Zantema A, de Jong E, Lardenoije R (1989). The expression of heat shock protein hsp27 and a complexed 22-Kilodalton protein is inversely correlated with oncogenicity of adenovirus-transformed cells. *J Virol* 63: 3368-3375.
13. Cascales M. (2002). *Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas*: Real Academia de Farmacia. Madrid
14. Ritossa F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
15. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM (1974). Protein synthesis in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398.
16. Gerner E W., Schneider MJ (1975). Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 256: 500-550.
17. Le GC, Werb Z. (1992). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3218-3222
18. Welch WJ. (1993). Respuesta de las células al estrés. *Investigación y Ciencia*: 21-29.
19. Craig EA. (1985). The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem*. 18:239-280.
20. Hightower LE. (1980). Cultured animal cells exposed to amino acid analogs or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell Physiol*: 407-427.

21. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*. 232:522-524.
22. Pelham HBR. (1985). *Trends Genet*. 1: 31-35.
23. Pelham HBR, Munro S. (1986). *Cell* 46: 291-300.
24. Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ (1988). Heat shock is lethal to fibroblast microinjected with antibodies against HSP70. *Science* 24: 433-436.
25. Li GC, Li L, Liu YK, Mak JY, Chen L, Lee WMF (1991). Thermal response of rat fibroblast stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1681-1685
26. Georgopoulos C, Ang D. (1991). The Escherichia coli groE chaperonins. *Semin Cell Biol*.1(1):19-25.
27. Levinthal C. (1968). *J Chem Phys* 65: 44-45.
28. Anfisen CB, Harber E. (1961) Studies on the reduction and reformation of protein disulfide bonds *J Biol Chem* 236: 1361-1363.
29. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfisen CB. (1963). Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver *J Biol Chem* 238: 628-635.
30. Houry WA. (2001). Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci* 2:227-244.
31. Nollen EA, Morimoto RI. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci*. 15;115(Pt 14):2809-2816.
32. Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int*. 41: 1098-1113
33. Parsell DA, Kowal AS, Lindquist S. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* Hsp 104 protein. Purification and characterization of ATP-induced changes. *J Biol Chem*. 269: 4480-4487
34. Kessel M, Wu WF, Gottesman S. Et al. (1996). Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E.Coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, Clp-Y. *FEBS Lett* 398: 274-278.
35. Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR y Vierling E. (1997). A small shock protein stably binds heat-denatured model substrate in a folding-competent state *EMBO J* 16: 659-671
36. Bukau B, Horwich AL. (1998). The HSP70 and HSP60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.
37. Hendrick JP, Hartl FU. Molecular functions of heat shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62: 349-384.
38. Glover JR, Lindquist S. (1998). Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94: 73-82.
39. Hayes SA, Dice JF. (1996). Role of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* 132: 255-258.
40. Hershko A. (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 21: 445.
41. Varshavsky A. (1997) The ubiquitin system. *Trends biochem sci* 22: 383-387.
42. Shaner L, Trott A, Goeckeler JL, Brodsky JL, Morano KA. (2004) The function of the yeast molecular chaperone Sse1 is mechanistically distinct from the closely related hsp70 family. *J Biol Chem* 279: 21992-2001.
43. Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR. (2000) The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* 5:276-290.
44. Goeckeler JL, Stephens A, Lee P, Caplan AJ, Brodsky JL. (2002) Overexpression of yeast HSP110 homolog Ssp1 suppressed *yjd1-101* thermosensitivity and restores HSP90-dependent activity *Mol Cell Biol* 22: 2760-2770



45. J. Liu X, Morano KA, Thiele DJ. (1999) The yeast Hsp110 family member, Sse1, is an Hsp90 cochaperone. *J. Biol Chem* 274: 26654-26660.
46. Young JC, Moaref I, Hartl FU (2001) HSP90: A specialized by essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154: 267-273.
47. Keller WL (1999) Molecular chaperones: how J domains turn on Hsp70s *Curr Biol* 9: R305-R308.
48. Ruddon RW, Bedows E. (1997) Assited protein folding *J Biol Chem* 272: 3125-3128.
49. Houry WA. (2001) Mechanism of substrate recognition by the chaperonin GroEL *Biochem Cell Biol* 79:569-577
50. Macario S, Lange M, Ahring B, Macario EC. (1999) Stress genes and proteins in the archaea *Moll Biol Rev* 63: 923-967.
51. Macario A, Macario EC. (1999) The archaeal meolecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes *Genetics* 152: 1277-1283.
52. Jakob U, Muse W, Eser M, Bardwell JCA. (1999) Chaperone activity with a redox switch *Cell* 96: 341-352.
53. Jakob U, Eser M, Bardwell JCA. (2000) Redox switch of HSP33 has a novel zinc-binding motif *J.Biol Chem* 275: 38302-38310.
54. Levoine JN. (1993) Induction of chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confere resistance to heat shock. HSP27 stabilitation pf the microfillament organitation *J.Biol Chem* 268: 3420-3429.
55. Ciocca DR, Osterreich S, Chamness GC, Macgreire WL, Fuqua SN. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27.000 Kd (Hsp27): a rewiev. *J. Natl. Cancer inst.* 85: 1558-1570.
56. Wagstaff MJD, Collaço-moraes Y, Smith J, De belloche JS, Coffin RS, Latchman DS. (1999) Protection of neuronal cells from apoptosis by HSP27 delivered with a herpes simple virus-based vector *J. Biol Chem* 274: 5.061-5.069.
57. Horwitz J. (2003) Alpha-crystallin. *Exp Eye Res.* 76:145-153.
58. Ganea E. (2001) Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins. *Curr Protein Pept Sci* ;2:205-225.
59. McBride WH, Iwamoto KS, Syljausen R, Pervan M, Pajonk F. (2003) The role of the ubiquitin/preteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene* 22: 5755-5773.
60. Schwartz TZ, Hochstrasser M. (2003) A superfamily of protein tags; ubiquitin SUMO and related modifiers *Trends Biochem Sci* 28: 321-328.
61. Adams J. (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell *Cancer Treat Rev* 29; suppl 1: 3-9.
62. Yang Y, Yu X. (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way *FASEB J.* 17: 790-799.
63. Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kigston RE (1991) Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6911-6915.
64. Nakai A, Morimoto RI. (1993) Characteritaton of a novel chicken heat shock transcription factor, suggest a new regulatory pathway. *Moll Cell Biol* 17: 1983-1997.
65. Fernandes M, Xiao H, Lis JT. (1994) Fine structure analyses of the Drosophila and Saccharomyces heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res.* 25;22:167-173.
66. Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K. (1997) HSF4, a new member of the human heat shock family which lacks properties of a transcripcional activator. *Moll Cell Biol* 17: 469-481.
67. Tai LJ, McFall SM, Huang K, Demeler B, Fox SG, Brubaker K, Radhakrishnan I, Morimoto RI. (2002) Structure-funtion analysis of the Heat Shock Factor-

- binding protein reveals a protein composed solely of a highly conserved and dynamic coiled-coil trimerization domain. *J Biol Chem* 277: 735-745.
68. Mathew A, Marthur S.K, Jolly C, Fox S.G, Soojin K, Morimoto R.I. (2001) Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21: 7163-7171.
  69. Haynes B.F, Fauci A.F. (1994) Bases celulares y moleculares de la inmunidad. En: Harrison, Principios de medicina interna (13ª edición). Madrid Ed: Interamericana McGraw-Hill. 1775-1793.
  70. Guyton AC. (1992) Resistencia del cuerpo a la infección: inmunidad y alergia. En: Guyton. Tratado de fisiología médica (8ª edición). Ed interamericana-McGraw-Hill. 389-399.
  71. Moseley P. (2000) Stress proteins and the immune response *Immunopharmacology*; 48: 299-302
  72. Gaston JS. (1992) Are heat shock proteins involved in autoimmunity? *Int J Clin Lab Res*; 22: 90-94.
  73. Kiang JG, Tsokos GC. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 80: 183-201.
  74. Welch WJ. (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure function of stress proteins and implication for medicine and disease. *physiological reviews*: 1063-1081.
  75. Kaufmann S, Schoel B. (1994) Heat shock proteins as antigens in immunity and self En: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones Ed: cold spring Harbor Laboratory press. 495-531.
  76. Matzinger P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 12;296:301-305.
  77. Wallin R, Lundquist A, Moré S.h, Von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. (2002) Heat-shock proteins as activator of the innate immune system. *TRENDS in immunology* . 23: 130-135
  78. More S.H. Breloer M, Von Bonin A. (2001) Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60-mediated activation of cytotoxic T cells *International Immunology* 13: 1121-1127
  79. Pockley A.G. (2003) Heat shock proteins as regulators of the immune response *Lancet* 362: 469-476.
  80. Benjamin IJ, McMillan DR. (1998) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 27;83:117-32.
  81. Biasucci LM, Liuzzo G, Ciervo A, Petrucca A, Piro M, Angiolillo DJ, Crea F, Cassone A, Maseri A. (2003) Antibody response to chlamydial heat shock protein 60 is strongly associated with acute coronary syndromes. *Circulation* 107:3015-3017.
  82. Kocsis J, Veres A, Vatay A, Duba J, Karadi I, Fust G, Prohaszka Z. (2002) Antibodies against the human heat shock protein hsp70 in patients with severe coronary artery disease. *Immunol Invest.* 31:219-231.
  83. Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegard J. (2002) Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens.* 20:1815-1820.
  84. Wu T, Ma J, Chen S, Sun Y, Xiao C, Gao Y, Wang R, Poudrier J, Dargis M, Currie RW, Tanguay RM. (2001) Association of plasma antibodies against the inducible Hsp70 with hypertension and harsh working conditions. *Cell Stress Chaperones.* 6:394-401.
  85. Tishler M, Shoenfeld Y. (1996) Anti-heat-shock proteins antibodies in rheumatic and autoimmune diseases *Semin Arthritis Rheum* 26: 558-563
  86. Pockley AG. (2001) Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and allograft rejection. *Transplantation.* 15;71:1503-1507.
  87. Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S, Kehayov I, Hristova S, Lacroix-Desmazes S, Giltiay N, Varamballi S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. (2002)

- Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. *Int Immunol.* 14:453-461
88. Gallin JI (1994) Trastornos cualitativos y cuantitativos de los leucocitos En Harrison Principios de medicina interna (13ª edición). Ed interamericana McGraw-Hill 386-396.
  89. Guyton AC. (1992) Resistencia del cuerpo a la infección: leucocitos, granulocitos, el sistema de macrófagos monocitos, e inflamación. En: Guyton. Tratado de fisiología médica (8º edición). Ed interamericana-McGraw-Hill.389-399.
  90. Iván Simón Gómez (2001) Proteínas de choque térmico en leucocitos polimorfonucleares humanos. Control farmacológico. Tesis Doctoral. Sobresaliente "cum laude". Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.
  91. Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Nakamori Y, Noborio M, Shiozaki T, Nishino M, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. (2001) Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclearleukocytes in patients with sepsis. *J Trauma* 51:1104-1109.
  92. Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Aoki M, Shiozaki T, Matsuoka T, Shimazu T, Sugimoto H. (2001) Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients. *J Trauma.* 50:102-107.
  93. Rodeberg DA, Meyer JG, Babcock GF. (1999) Heat shock response: presence and effects in burn patient neutrophils *J Leukoc Biol*;66:773-780.
  94. Hennigan SM, Wang JH, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. (1999) Neutrophil heat shock protein expression and activation correlate with increased apoptosis following transmigration through the endothelial barrier. *Shock.* 12:32-38.
  95. Callahan TE, Marins J, Welch WJ, Horn JK. (1999) Heat shock attenuates oxidation and accelerates apoptosis in human neutrophils. *J Surg Res.* 85:317-322.
  96. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB. (2003) Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem.* 278:27828-27835.
  97. Sheth K, De A, Nolan B, Friel J, Duffy A, Ricciardi R, Millar-Grazano C, Bankey P. (2001) Heat shock protein 27 inhibits apoptosis in human neutrophils *J Surg Res* 99: 129-133.
  98. Fraile JR, Yuste AS, Ferrando A, Quintana B. (2005) Respuesta neuroendocrina e inmunológica a la anestesia y la cirugía. En: Fisiología aplicada a la anestesiología (2º edición). Fundación europea para la enseñanza de la anestesiología en la formación continuada (F.E.E.A). Madrid. 431-452.
  99. Desborough JP. (2000) The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 85: 109-117.
  100. Chrousos GP, Gold PW. (1992) The concept of stress and stress system disorders. *JAMA* 267: 1244-1252.
  101. Chrousos GO. (1995) The hypothalamic- pituitary adrenal axis and the immune-mediated inflammation *N Engl J Med* 332: 1351-1362.
  102. Davies MG, Hagen PO. (1997) Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg.* 84:920-935.
  103. Laffey JG, Boylan JF, Cheng DCH. (2002) The systemic inflammatory response to cardiac surgery. *Anesthesiology* 97: 215-252.
  104. M. Salo (2001) Fisiología del sistema inmune. En: Torres LM. Tratado de anestesia y reanimación. Ed Arán. 519-550.
  105. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. (1997) Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest.* 99:944-952.
  106. Parker JC, Hernandez LA, Peavy KJ. (1993) Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* 21:131-143.

107. Gama de Abreu M, Heintz M, Heller A, Szechenyi R, Albrecht DM, and Koch T (2003) One-Lung Ventilation with High Tidal Volumes and Zero Positive End-Expiratory Pressure Is Injurious in the Isolated Rabbit Lung Model *Anesth. Analg.* 96: 220 - 228.
108. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. (1983) Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 86:845-857
109. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K. (1995) Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest.* 107:1062-1073.
110. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. (1995) A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol.* 15;154:5492-5499.
111. Herskowitz A, Mangano DT. (1996) Inflammatory cascade. A final common pathway for perioperative injury? *Anesthesiology.* 85:957-960.
112. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. (1990) Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond).* 79:161-165.
113. Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. (1999) Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica.* 84:254-259.
114. Barbato JE, Tzeng E. (2004) Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg.*;40:187-193.
115. Huang PL. (2003) Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 5:473-480.
116. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54: 469-487.
117. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. (1997) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg.* 63: 277-284.
118. Adib-Conquy M, Moine P, Asehounne K, Edouard A, Espevik T, Miyake K, Werts C and Cavillon J-M (2003) Toll-like Receptor-mediated Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Production Differ during Systemic Inflammation *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 168: 158 – 164
119. Kenion CJ, McNeil LM, Fraser R. (1985) Comparison of the effects of etomidate, thiopentone and propofol on cortisol synthesis. *Br J Anaesth* 57: 509-511.
120. Moraca RJ, Sheldon DG, Thirlby RC. (2003) The role of epidural anesthesia and analgesia in surgical practice. *Ann. surg.* 238: 663-673
121. Rodgers A, Walker N, Schug S, McKee A, Kehle H, Van Zundert A, Sage D, Fitter M, Saville G, Clark T, MacMahon S. (2000) Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials *BMJ* 321: 1493-1497.
122. Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Yasuda T, Ebina T, Muraoka M, Matsuki A. (1999) Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. *Anesth Analg.* 89:1250-1256.
123. Crozier TA, Muller JE, Quittkat D, Sydow M, Wuttke W, Kettler D. (1994) Effect of anaesthesia on the cytokine responses to abdominal surgery. *Br J Anaesth.* 72: 280-285.
124. Oh WS. (2002) Effect of fentanyl on TNF-alpha and IL-1beta levels during global ischemia/reperfusion in rats. *Int J Tissue React.* 24:11-21.

125. Mitsuhashi H, Shimizu R, Yokoyama MM. (1995) Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol.* 17:529-534.
126. Kotani N, Takahashi S, Sessler DI, Hashiba E, Kubota T, Hashimoto H, Matsuki A. (1999) Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology.* 91:187-197.
127. Moore CM, Desborough JP, Powell H, Burrin JM, Hall GM. (1994) Effects of extradural anaesthesia on interleukin-6 and acute phase response to surgery. *Br J Anaesth.* 72: 272-279.
128. Høgevoid HE, Lyberg T, Kahler H, Haug E, Reikeras O. (2000) Changes in plasma IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 after total hip replacement surgery in general or regional anaesthesia. *Cytokine.* 12:1156-1159.
129. Yeager MP, Lunt P, Arruda J, Whalen K, Rose R, DeLeo JA. (1999) Cerebrospinal fluid cytokine levels after surgery with spinal or general anesthesia. *Reg Anesth Pain Med.* 24: 557-562.
130. Norman JG, Fink GW. (1997) The effects of epidural anesthesia on the neuroendocrine response to major surgical stress: a randomized prospective trial. *Am Surg.* 63:75-80.
131. Udelsman R, Blake MJ, Holbrook NJ. (1991) Molecular response to surgical stress: specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta, and vena cava. *Surgery.* 110:1125-1131.
132. Pannen BH, Maeda K, Ayuse T, Brienza N, Revelly JP, Robotham JL, Buchman TG. (1995) Hepatic heat shock and acute-phase gene expression are induced simultaneously after celiotomy in the anesthetized pig. *Anesthesiology.* 83:850-859.
133. Boeri D, Dondero F, Storace D, Maiello M, Pasqualini M, Pellici R. (2003) Heat-shock protein 70 favours human liver recovery from ischemia-reperfusion *Eur J Clin Invest* 33: 500-504.
134. Giannessi D, Caselli C, Vitale RL, Crucean A, Murzy B, Ry SD, Vianini V, Biagini A. (2003) A possible cardioprotective effect of heat shock proteins during cardiac surgery in pediatric patient *Pharmacol Res.* 48: 519-529.
135. St Rammos K, Koullias GJ, Hassan MO, Argyrakis NP, Voucharas CG, Scarupa SJ, Cowte TG. (2002) Low preoperative HSP70 atrial myocardial levels correlate significantly with high incidence of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg.* 10: 228-232.
136. Ricchi A, Cardu G, Lettieri B, Fusar-poli DE, Tacchini C, Berzelli-Zazzera A, Corbucci GG. (2001) Biomolecular and biochemical response of myocardial cell to ischemia and reperfusion in the course of heart surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 42: 605-610.
137. Demidov ON, Tyrenko VV, Svistov AS, Komarova YY, Karpishenko AI, Margulis BA, Shevchenko YL. (1999) Heat shock proteins in cardiosurgery patients. *Eur J Cardiothoracic Surg* 50: 115-124.
138. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. (2002) Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signalling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105: 685-690.

139. Hammerer-Lercher A, Mair J, Bonatti J, Watzka SB, Puschendorf B, Dimhofer S. (2001) Hypoxia induces heat shock protein expression in human coronary artery bypass grafts. *Cardiovasc Res.* 50: 115-124.
140. Storti S, Vittorini S, Luisoi VS, Saccheli M, Collavoni A, Vanini V, Biagini A, Clerico A. (2001) No variation in HSP70 mRNA level during cardiac surgery in pediatric patients evaluated by semiquantitative RT-PCR. *Clin Chem Lab Med.* 39; 1240-1243.
141. Schafner AE, Kirmanoglou K, Gallmeier U, Pecher P, Hannekum A, Schumacher B. Heat shock protein 60 expression in patient undergoing cardiac operations. *J cardiovasc surg (Torino)* 44: 187-190.
142. Hiratsuka M, Yano M, Mora BN, Hagahiro I, Cooper JD, Patterson GA. (1998) Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung transplant* 17: 1238-1246.
143. Suzuki K, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Brand NJ, Yakoub MH (2000) Heat shock enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 102 (19 suppl 3): III216-221.
144. Colucci D, Ferrero P, Ferreyra P, Elena G, Puig NR. (2003) Effects of sevoflurane anesthesia on the immune response and biochemical parameters in mice. Comparison between single exposure and repeated anesthesia. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 50: 170-175.
145. Michils A, Redivo M, Zegers de Beyl V, De maerstelaer V, Jakobovitz D, Rocmans P, Duchateau. (2001) Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer.* 1: 59-67.
146. Oka M, Sato S, Soda H, Fukuda M, Kawabata S, Nakatomi K, Shiozawa K, Nakamura Y, Ohtsuka K, Kohno S. (2001) Autoantibody to heat shock protein Hsp40 in sera of lung cancer patients *Jpn J Cancer Res.* 92: 316-320.
147. Zhong L, Peng X, Hidalgo GE, Doherty DE, Stromberg AJ, Hirschowitz EA. (2003) Antibodies to HSP70 and HSP90 in serum in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Detect Prev.* 27: 285-290.
148. Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Krawczyk Z. (2001) Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP27 in primary non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical study. *Anticancer Res.*;21(2A):1015-1021.
149. Watkin SS. (2001) Heat shock protein expression and immunity: relevance to gynecologic oncology. *Eur J. Gynaec. Oncol* 22: 249-256.
150. Frese S, Schaper M, Kuster JR, Miescher D, Jaattela M, Buehler T, Schmid RA. (2003) p53-induced down-regulation of heat shock protein 70 in lung cancer cell lines is p53-independent and does not require DNA cleavage. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126:748-54.
151. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent *Journal of biological chemistry* 193 265-275.
152. Peterson, Gary L. (1979) "review of the folin phenol protein detection method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall" *Analytical Biochemistry* 100: 201-220.
153. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*;227:680-5.

154. Minna JD. (1994) Neoplasias pulmonares En Harrison Principios de medicina interna (13ª edición). Ed interamericana Mcgraw-Hill: 1403-1414.
155. Vayssier-Taussat M, Camilli T, Aron Y, Meplan C, Hainaut P., Polla B.S, Weksler B. (2001) Effects of tobacco smoke and benzo[a]pyrene on human endothelial cell and monocyte stress responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* .280: 1293-1300.
156. Chana F. (2004) Proteínas de choque térmico en las artroplastias totales de rodilla: posibles biomarcadores de infección protésica. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UCM.
157. Boshoff T, Lombard F, Eiselen R, Bornman JJ, Bachelet M, Polla BS, Bornman L. (2000). Differential basal synthesis of Hsp70/Hsc70 contributes to interindividual variation in Hsp70/Hsc70. *Cell mol life. sci.*;57:1317-1325.
158. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. (1993) Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*.88:1264-1272.
159. Mortaz E, Redegeld FA, Bloksma N, Dunsmore K, Denenberg A, Wong HR, Nijkamp FP, Engels F. (2006) Induction of HSP70 is dispensable for anti-inflammatory action of heat shock or NSAIDs in mast cells. *Exp Hematol*;34:414-423.
160. Tamion F, Richard, Lacoume Y, Thuillez C. (2002) Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-1. *AJP Gastrointest Liver Physiol* 283: G408-G414.
161. Villar J. (2000) Heat shock protein gene expression and survival in critical illness. *Crit Care*. 4: 2-5.
162. Witkin S.S. (2001) Heat shock protein expression and immunity: relevance to gynecologic oncology. *Eur. J. Gynaec. Oncol* 22: 249-256.
163. Blachere NE, Udono H, Janetzki S, Li Z, Heike M, Srivastava PK. (1993) Heat shock protein vaccines against cancer. *J Immunother*. 14: 352-356.
164. Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker PH, Elias D, Levine EA, De Simone M, Barone R, Yonemura Y, Cavaliere F, Quenet F, Gutman M, Tentes AAK, Lorimier G, Bernard JL, Bereder JM, Porcheron J, Gomez-Portilla A, Shen P, Deraco M, Rat P (2004). Cytoreductive Surgery Combined With Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy for the Management of Peritoneal Carcinomatosis From Colorectal Cancer: A Multi-Institutional Study. *J. Clin. Oncol*. 22: 3284 - 3292.
165. Pilati P, Mocellin S, Rossi CR, Foletto M, Campana L, Nitti D, Lise M. (2003) Cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal intraoperative chemotherapy for peritoneal carcinomatosis arising from colon adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 10:508-513.

