



## Original

# Proteínas de choque térmico 70 kDa en estrés quirúrgico: toracotomía vs herniorrafia <sup>☆</sup>

Rafael Ramos Fernández<sup>a</sup> y María Concepción Guisasola Zulueta<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Anestesia, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

<sup>b</sup>Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 4 de noviembre de 2009

Aceptado el 17 de marzo de 2010

On-line el 12 de mayo de 2010

## Palabras clave:

Estrés quirúrgico

Proteínas de choque térmico

Polimorfonucleares neutrófilos

Respuesta autoinmune

## RESUMEN

**Introducción:** Como consecuencia de los procedimientos quirúrgicos, se produce una respuesta de estrés oxidativo con liberación de citoquinas y especies reactivas de oxígeno que activan la Heat Shock Response (HSR, 'respuesta de choque térmico') o respuesta al estrés, con un incremento en la síntesis de Heat Shock Proteins (HSP, 'proteínas de choque térmico').

**Objetivo:** Estudiar la biología de las Hsps70 intraleucocitarias y la IL-6 como posibles biomarcadores de la inflamación postquirúrgica, y una potencial respuesta anti-Hsp70, en pacientes sometidos a 2 situaciones quirúrgicas de distinta intensidad.

**Material y métodos:** Estudio longitudinal de cohortes, con un grupo de pacientes sometidos a toracotomía bajo anestesia general (n=11), un grupo de pacientes sometidos a herniorrafia inguinal bajo anestesia locoregional (n=10) y un grupo de donantes voluntarios sanos (n=6). Se analizaron Hsps70 intraleucocitarias, Ac anti-hsp70 e IL-6 inmediatamente antes y a las 24 h de la cirugía.

**Resultados:** Los pacientes toracotomizados mostraron una disminución significativa de Hsp70 intraleucocitaria y de Ac anti-Hsp70 en el postoperatorio inmediato. Los pacientes con mayores descensos de Hsp70 postoperatoria presentaron diversas complicaciones postquirúrgicas. Ambos grupos presentaron un significativo aumento postoperatorio de los niveles de IL-6.

**Conclusiones:** Cuanto más agresiva es la cirugía, mayor reducción de Hsp70 se produce en el postoperatorio, especialmente en pacientes con peor evolución, lo que ha llevado a proponer a la Hsp70 como marcador pronóstico postquirúrgico. El significativo incremento de IL-6 en ambos grupos, permite concluir que la dispar respuesta al estrés quirúrgico entre ambos grupos se debe no a la respuesta inflamatoria sistémica, sino a la HSR.

© 2010 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Parte de la información de este manuscrito ha sido presentada en el 2009 Annual Meeting of the Society for the Leukocyte Biology, International Cytokine Society & International Society for Interferon and Cytokine Research. Lisboa, Portugal, 18-21 de octubre de 2009.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mguisasola@mce.hggm.es (M.C. Guisasola Zulueta).

## 70 kDa heat-shock proteins in surgical stress: thoracotomy vs. Herniorrhaphy

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Surgical stress  
Heat shock proteins  
Polymorphonuclear neutrophils  
Autoimmune response

**Introduction:** During and after surgical procedures, there is an oxidative stress response that releases cytokines and reactive oxygen species. This can activate Heat Shock Response (HSR), leading to an increase in Heat Shock Proteins (HSPs) expression proportional to the intensity of the stimulus.

**Objective:** This study examined the biology of intraleucocyte Hsps70 and IL-6 as potential biomarkers of postoperative inflammatory stress, and a potential antiHsp70 autoimmune reaction in patients undergoing two surgical procedures of different severity.

**Material and methods:** Longitudinal cohort study including a group of patients undergoing thoracotomy under general anaesthesia (n=11), a group of patients undergoing inguinal hernia repair under regional anaesthesia (n=10), and a group of healthy controls (n=6). Intraleucocyte Hsps70, antiHsp70 antibodies and IL-6 were analysed, just before and 24 h after surgery.

**Results:** Patients undergoing thoracotomy showed a significant decrease in intraleucocyte Hsp70 and antiHsp70 antibodies in the early postoperative period; patients with the greatest Hsp70 decreases after surgery showed the lowest pre-surgical Hsp70 levels and these patients also experienced various postoperative complications. A significant postoperative increase in IL-6 levels in both groups was observed.

**Conclusions:** Patients undergoing a more aggressive surgery showed a significant Hsp70 reduction in the postoperative period. Patients with the lowest values of Hsp70 in the immediate postoperative period had the worst clinical course, which has led to propose use of Hsp70 as a prognostic post-surgical marker. The postoperative decrease in intracellular Hsp70 is parallel to the decrease in circulating autoantibodies. The different response of both groups to surgical stress is not due to systemic inflammatory response, but to HSR.

© 2010 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Durante el desarrollo de los procedimientos quirúrgicos y tras finalizar los mismos, se produce una respuesta de estrés oxidativo que comprende tanto la activación de mediadores inflamatorios, metabólicos, endocrinos e inmunológicos, entre ellos la Interleuquina-6 (IL-6)<sup>1</sup> como la denominada *Heat Shock Response* (HSR, 'respuesta de choque térmico') o respuesta al estrés<sup>2</sup>; esta produce un incremento en la síntesis de las *Heat Shock Proteins* (HSP, 'proteínas de choque térmico'), inducción que es proporcional a la intensidad del estímulo<sup>3</sup>. Las HSP se clasifican en familias de acuerdo con su peso molecular, de las cuales la familia HSP70 es la más ampliamente estudiada y contiene miembros que se expresan de forma constitutiva, Hsc70 (HSPA8), y miembros que lo hacen de forma inducida, Hsp70 (HSPA1A). El papel citoprotector de Hsp70, está ampliamente documentado en enfermedades humanas<sup>4</sup>. Aunque clásicamente conceptuadas como proteínas intracelulares, recientemente se ha descrito su liberación al torrente circulatorio, bien por un mecanismo pasivo desde células necróticas como en la cirugía<sup>5</sup> o bien por mecanismos activos desde células viables. Las Hsps circulantes son moléculas inmunomoduladoras que actúan como potentes autoantígenos<sup>6</sup>. Su

reconocimiento por linfocitos T desencadena una respuesta autoinmune que se ha relacionado con patologías como la aterosclerosis<sup>7</sup>.

Las diferentes técnicas anestésicas modulan la respuesta al estrés: en las técnicas con bloqueo de la transmisión nerviosa (anestesia locorregional) se interrumpe la conexión neuroinmunoendocrina y no existe inhibición cortical cerebral; en la anestesia general se silencia la actividad cortical pero sigue siendo operativa la conexión señalada<sup>8</sup>.

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), pertenecen a la primera línea de reconocimiento y de defensa ante agresiones externas gracias a receptores toll que los convierte en una de las células comprometidas en la respuesta inmune innata<sup>9</sup>. El estrés oxidativo activa los PMN e induce en ellos la síntesis de HSP las cuales tendrían un importante papel en la autoprotección de estas células productoras a su vez de radicales libres de oxígeno<sup>10,11</sup>.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la biología de las Hsps70 intraleucocitarias y la IL-6 como posibles biomarcadores de la inflamación postquirúrgica en pacientes sometidos a 2 situaciones quirúrgicas de distinta intensidad: a) toracotomía (agresión mayor con anestesia general, y b) cirugía de herniorrafia (agresión menor con anestesia locorregional). Además se analizó una posible reacción

autoinmune antiHsp70 en respuesta a los 2 distintos grados de agresión quirúrgica.

## Material y métodos

### Diseño del estudio

Estudio longitudinal de cohortes, con un grupo de pacientes sometidos a toracotomía bajo anestesia general, un grupo de pacientes sometidos a una reparación de hernia inguinal con anestesia regional y otro de controles sanos. El tamaño muestral se calculó en términos de potencia estadística por el departamento de epidemiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (HGUGM) de acuerdo a los resultados obtenidos previamente en un estudio piloto<sup>12</sup>.

Se incluyeron 21 pacientes varones ingresados en los departamentos de cirugía y de anestesia y reanimación del HGUGM. Seis varones controles voluntarios sanos pareados por edad, proporcionaron los valores de referencia. El estudio fue aprobado por la comisión de investigación y la comisión de ética de la investigación clínica. Los pacientes y voluntarios fueron asignados a uno de los siguientes grupos: grupo I, controles voluntarios sanos (n=6); grupo II, pacientes sometidos a toracotomía para la realización de lobectomía bajo anestesia general (n=11); grupo III: pacientes sometidos a una reparación de hernia inguinal con anestesia regional (n=10). A todos los participantes se les realizó una anamnesis, exploración física y determinaciones analíticas para comprobar que clínicamente se encontraban libres de enfermedad infecciosa y/o autoinmune, así como una revisión de la historia clínica y del preoperatorio. Inmediatamente antes de la cirugía se extrajeron 5 ml de sangre en tubos no heparinizados para la obtención de suero y 20 ml de sangre en tubos con EDTA para aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. 24 h después de concluir la cirugía se obtuvo una segunda muestra de características similares, en los grupos de estudio.

### Métodos analíticos

#### 1. Obtención de suero

Tras la extracción de la sangre, se dejaron los tubos durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo. Se centrifugaron 15 min a 3.500 rpm a 4 °C y se tomó el sobrenadante. Las muestras de suero se guardaron a -70 °C hasta su procesamiento.

#### 2. Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN)

La sangre se obtuvo por venopunción en tubos de vacío venoJect™ conteniendo EDTA 0,47 mM/l, 21 w/v % (se excluyeron otros anticoagulantes que activan los polimorfonucleares como el citrato o la heparina). El aislamiento de PMN se realizó por gradiente, centrifugando la sangre a 450-500 g, durante 30 min en Polymorphprep™ (Nycomed, Oslo, Norway). Se tomó la banda de los PMN y se depositó sobre 10 ml de una solución tamponada de fosfatos, PBS (17,11 mM NaCl, 0,335 mM KCl, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,016 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); se centrifugó 5 min a 450 g. Para evitar posible

contaminación por eritrocitos, se sometieron las células a choque osmótico añadiendo agua destilada estéril fría. Se centrifugaron 5 min a 450-500 g y se decantó el sobrenadante. El precipitado con los PMN se resuspendió en 100 µl de tampón de ruptura RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa: PMSF 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml y pepstatina 10 µg/ml. Los lisados celulares se homogenizaron mediante 40 pases de homogenizador Kontes y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Se guardó el sobrenadante a -70 °C hasta su posterior procesamiento.

#### 3. Valoración del contenido proteico de los lisados celulares

El contenido en proteínas de la fracción soluble se valoró por el método de microensayo de Lowry, utilizando el kit para valoración de proteínas Bio-Rad frente a una curva patrón de albúmina (0-10 µg/ml) (albúmina sérica bobina, BSA, Bio-Rad).

#### 4. Inmunoblotting

Tras realización de una electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS), se identificaron la Hsc70 y la Hsp70 intracelulares mediante western-blot. Brevemente, los geles de poliacrilamida son trasladados a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore) y en estas se bloquean las uniones inespecíficas por incubación con leche en polvo desnatada 3% (p/v) en PBS- tween 20 (Bio-Rad, 0,05% (v/v)). Se lavan 3 veces con PBS- Tween 20 0,05% (v/v) y posteriormente se incuban con Ac monoclonales (Streessgen, SPA 815 - Hsc70-, SPA 810 -Hsp70) diluidos 1:1.000 en 0,05% PBS-Tween 20 (v/v)-0,5% BSA (p/v). Se lavan 3 veces y se incuban con un segundo Ac anti IgG de ratón conjugado con biotina (Amersham). La señal se amplifica mediante incubación con HPR (horseradish peroxidase streptavidin) (Amersham). Se revelan con 4-cloro-1-naphtol (Sigma) como sustrato. La identificación de las proteínas en estudio se completó por su peso molecular, tomando como referencia las bandas coloreadas de los patrones, que se corren paralelos a las muestras (Rainbow Markers Amersham).

Las imágenes de las bandas se digitalizaron con un escáner SCANJET-II CX (Hewlett-Packard) y se procesaron mediante software Scil-Image. El gris total de las muestras problema se normalizan a la media de los grises de las muestras control y la cuantificación del contenido en Hsc70 y Hsp70 de las muestras problema se expresaron en Unidades Arbitrarias (UA).

#### 5. Cuantificación de Ac antiHsp70

Los Ac antiHsp70 se cuantificaron en suero diluido 1:1000 utilizando un kit comercial de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (EKS-750, Anti Human Hsp70 (IgG/IgM/IgA) ELISA Kit, Stressgen). Los resultados obtenidos se expresan en micro µg/ml. La linealidad fue 31,25-1.000 µg/ml y la sensibilidad, 6,79 µg/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron <10%.

#### 6. Cuantificación de interleuquina 6 (IL-6)

La concentración de IL-6 sérica se midió mediante un kit comercial de ELISA (MedSystems Diagnostics GMBH, BMS213/2<sup>®</sup>). La concentración de IL-6 de cada muestra se calculó por interpolación en una curva estándar y se expresa en pg/ml. Los valores séricos normales están en

un rango de 0-14,1pg/ml, con una media de 1,3pg/ml y una desviación estándar de 3,2pg/ml.

#### 7. Estudio estadístico

Todos los procedimientos se hicieron al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y se compararon mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov, t de Student para datos apareados y ANOVA para datos ajustados a la normalidad y los test de Wilcoxon, Mann-whitney y Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Se aceptó una significación estadística cuando  $p < 0,05$ . Se utilizó el paquete estadístico SPSS 12.0 para Windows.

## Resultados

Los 3 grupos fueron homogéneos tanto en variables sociodemográficas (edad, peso, talla), como en parámetros analíticos (glucemia, urea, creatinina, aspartatoaminotransferasa, lactodeshidrogenasa, sodio, potasio y hemoglobina); también lo fueron en el contenido de Hsc70 y Hsp70 basal (tabla 1).

En el postoperatorio inmediato, se aprecia una tendencia al descenso de la concentración de Hsps70 intraleucocitarias, que es estadísticamente significativa para la Hsp70 en pacientes toracotomizados, mientras permanecen sin alteraciones en los

pacientes sometidos a herniorrafia inguinal (tabla 2). Los 4 pacientes del grupo II con los máximos descensos de Hsps70 tras la intervención quirúrgica, tenían los menores niveles de Hsps70 preoperatoria (fig. 1) y eran portadores de patologías inflamatorias previas (TB, colitis ulcerosa, quimioterapia). Fueron además los pacientes con diversas complicaciones postoperatorias.

Igualmente se objetivó que los pacientes operados de hernia inguinal presentaron niveles de Ac antiHsp70 estables antes y después de la intervención, mientras que se demostró un descenso postoperatorio significativo en los pacientes sometidos a toracotomía (tabla 3, fig. 2). De forma semejante, los pacientes de este grupo con patología inflamatoria previa, presentaban los niveles de Ac más altos previamente a la intervención.

El análisis de interleuquina 6 reveló una elevación significativa de la misma en el postoperatorio en ambos grupos sin que existan diferencias significativas entre ambos grupos entre sí (tabla 4).

## Discusión

La respuesta al estrés quirúrgico y anestésico incluye tanto una respuesta de estrés oxidativo como una respuesta de

**Tabla 1 – Valores demográficos, analíticos y contenido en Hsps 70 preoperatorios (media  $\pm$  desviación típica)**

	Control	Herniorrafia	Toracotomía	*p
Edad (años)	59 $\pm$ 12	63 $\pm$ 17	63 $\pm$ 15	**N.S.
Hemoglobina(gr/dl)	14,7 $\pm$ 0,8	14,6 $\pm$ 1,7	14,3 $\pm$ 1,3	**N.S.
Glucemia (mg/dl)	99 $\pm$ 10	87 $\pm$ 14	124 $\pm$ 49	**N.S.
Urea (mg/dl)	41 $\pm$ 11	42 $\pm$ 13	42 $\pm$ 18	**N.S.
Creatinina (mg/dl)	1,15 $\pm$ 0,3	1,08 $\pm$ 0,2	1,02 $\pm$ 0,4	**N.S.
AST (UI/L)	18 $\pm$ 6	22,6 $\pm$ 7	20 $\pm$ 12	**N.S.
LDH (UI/L)	280 $\pm$ 84	311 $\pm$ 36	261 $\pm$ 10	**N.S.
Sodio (meq/L)	140 $\pm$ 2	138 $\pm$ 2,4	137 $\pm$ 2,5	**N.S.
Potasio (meq/L)	4,2 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,2	**N.S.
Hsc70 (UA)	1,10 $\pm$ 0,11	1,01 $\pm$ 0,31	0,8 $\pm$ 0,26	**N.S.
Hsp70 (UA)	0,95 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,4	0,74 $\pm$ 0,24	**N.S.

UA: Unidades Arbitrarias tomadas de la normalización del gris total de las bandas de inmunoblot de las muestras problema con respecto a las muestras control.

\* p: referido a las diferencias de las medias entre los grupos según el análisis de varianza de una cola (ANOVA one-way).

\*\* N.S: no significativo.

**Tabla 2 – Contenido en Hsc70 y Hsp70 antes y después de la intervención quirúrgica, en pacientes sometidos a cirugía de toracotomía (n = 11) y en pacientes sometidos a herniorrafia inguinal (n = 10)**

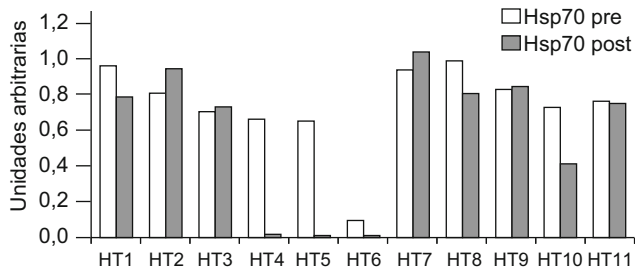
		Toracotomía (n = 11)	*p	Herniorrafia (n = 10)	*p
Hsc70 (UA)	Preoperatorio	0,8 $\pm$ 0,1	NS	1,01 $\pm$ 0,1	NS
	Postoperatorio	0,70 $\pm$ 0,1		0,88 $\pm$ 0,1	
Hsp70 (UA)	Preoperatorio	0,74 $\pm$ 0,1	<0,05	0,72 $\pm$ 0,1	NS
	Postoperatorio	0,57 $\pm$ 0,0		0,73 $\pm$ 0,1	

UA: Unidades Arbitrarias tomadas de la normalización del gris total de las bandas de inmunoblot de las muestras problema con respecto a las muestras control. Resultados expresados como media  $\pm$  SEM.

\* Referido al efecto del tratamiento según el Test de Student para datos apareados.

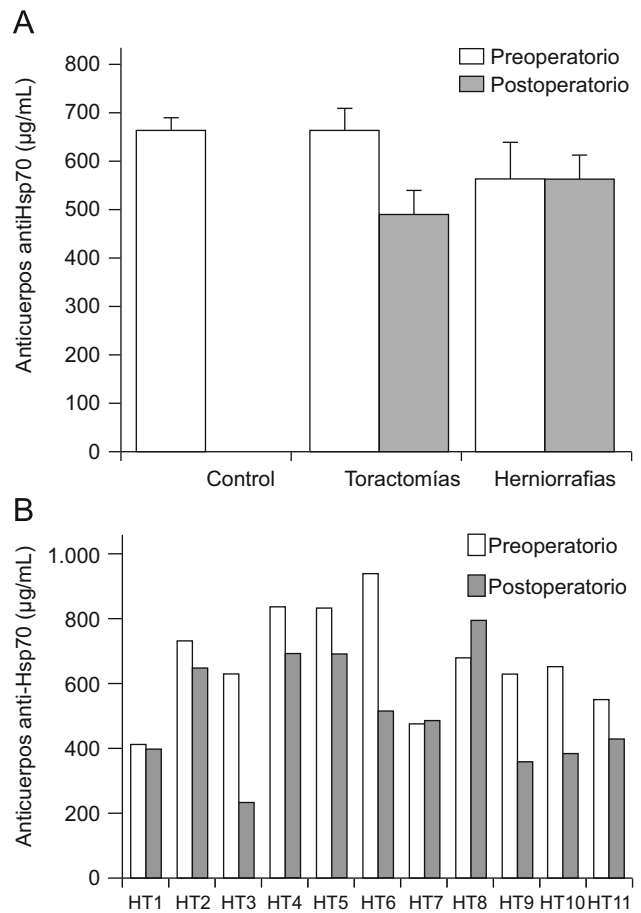
choque térmico con activación de los genes *hsp*s y especialmente de *hsp70*<sup>13</sup>, cuya intensidad está en función de la severidad de la agresión quirúrgica<sup>14</sup>. Pese a ello, en el presente estudio se ha objetivado una significativa disminución postoperatoria de Hsps70 en el grupo de pacientes sometidos a la mayor agresión quirúrgica. Ello podría explicarse porque el estrés anestésico quirúrgico intenso y prolongado, desencadenaría una rápida respuesta de estrés que induciría la síntesis inmediata de grandes cantidades de Hsp70. La sobreexpresión de Hsp70 inhibe la activación del factor de transcripción de choque térmico (Heat Shock Factor, HSF) y en consecuencia, la transcripción génica con disminución consecuente de la traducción proteica<sup>15</sup>. La disminución postoperatoria de los niveles de Hsp70 detectada en este grupo de enfermos podría ser también, consecuencia de un excesivo consumo dado el específico papel de Hsp70 de los PMN en la neutralización de las especies reactivas de oxígeno<sup>16</sup>.

Una de las características diferenciales en el estudio de la biología de las proteínas de choque térmico en humanos, es la gran variabilidad interindividual de su síntesis basal<sup>17</sup>. Entre los factores que podrían contribuir a la expresión diferencial de Hsps basales figuraría el status antioxidante del paciente, el cual modula la activación del HSF a través de los niveles de los radicales libres de oxígeno<sup>18</sup>. Los pacientes que tenían los menores niveles de Hsps70 antes de la intervención eran portadores de enfermedades inflamatorias previas, lo cual puede determinar un menor estado prooxidante por sobreestimulación del sistema<sup>19</sup>. El grado de síntesis basal de Hsps70



**Figura 1 - Contenido individualizado de Hsp70 (HSPA1A) antes y después de la intervención de toracotomía. Los pacientes con menor contenido de Hsp70 preoperatoria, eran portadores de patologías inflamatorias previas, y presentaron los mayores descensos en el posoperatorio así como complicaciones postquirúrgicas.**

se correlaciona con el porcentaje de inducción de síntesis de Hsps70 tras un estímulo bien ex-vivo, o in vivo, lo que explica la diferente tolerancia al estrés y la dispar susceptibilidad individual a la enfermedad<sup>20</sup>. En el presente estudio, los pacientes con menores niveles de Hsps70 preoperatorios presentaron también los valores más bajos en el postoperatorio inmediato, y además fueron los de peor evolución clínica. Hsp70 posee propiedades antiinflamatorias debido a su inhibición en la expresión de citoquinas proinflamatorias<sup>21</sup>



**Figura 2 - A) Cuantificación de Ac antiHsp70 antes y después de la cirugía. Resultados expresados en µg/ml (media ± SEM). \* p < 0,05 referido al efecto del tratamiento según el Test de Student para datos apareados. B) Cuantificación individualizada de Ac anti-Hsp70 antes y después de la intervención de toracotomía.**

**Tabla 3 - Cuantificación de Abs antiHsp70 antes y después de la intervención quirúrgica, en pacientes sometidos a cirugía de toracotomía (n = 11) y en pacientes sometidos a herniorrafia inguinal (n = 10)**

Anti-Hsp70 (µg/ml)	Preoperatorio	Postoperatorio	*P
Toracotomías (n = 11)	662 ± 45,2	490 ± 47,9	< 0,05
Herniorrafias (n = 10)	561 ± 76,2	559 ± 50,9	Ns
Controles (n = 6)	660 ± 26,9		

Resultados expresados como media ± SEM (µg/ml).

\* Referido al efecto del tratamiento según el Test de Student para datos apareados.

**Tabla 4 – Cuantificación de IL-6 antes y después de la intervención quirúrgica, en pacientes sometidos a cirugía de toracotomía (n=11) y en pacientes sometidos a herniorrafia inguinal (n=10)**

IL-6 (pg/ml)	Preoperatorio	Postoperatorio	*p
Toracotomías (n=11)	2,91±2,05	20,03±5,01	< 0,001
Herniorrafias (n=10)	4,99±3,54	18,3±5,79	< 0,001
Controles (n=6)	2,74 ±2,12		

Resultados expresados como media ± SEM (pg/ml).  
\* Referido al efecto del tratamiento según el Test de Mann-Whitney.

y de factores de transcripción proinflamatorios como el factor nuclear  $\kappa\beta^{22}$ , lo que protegería a las células de los efectos deletéreos de la respuesta inflamatoria y niveles bajos de Hsp70 promoverían un estado proinflamatorio; ello ha llevado a proponer la Hsp70<sup>20</sup> como marcador pronóstico, en individuos en riesgo, de desarrollar complicaciones postoperatorias. Su monitorización podría permitir a cirujanos y anestesiólogos modificar actuaciones quirúrgicas, e incluso intentar incrementar sus niveles antes de la intervención para mejorar la evolución postoperatoria. Actualmente se ha demostrado que pequeños cambios en el estilo de vida, incluyendo el ejercicio físico, tienen probados efectos en el incremento de los niveles de Hsp70<sup>23</sup> y el tratamiento de ciertos tumores con vacunas-Hsp70 es ya un hecho contrastado<sup>24</sup>.

Se ha descrito que Hsp70 participa también en la respuesta inmune innata interactuando con receptores toll-like<sup>25</sup> así como en fenómenos de autoinmunidad; ello se justifica por un doble mecanismo, de una parte por la liberación de Hsps desde células necróticas<sup>26</sup>, y de otro, por el transporte desde células viables de Hsps del citosol a la membrana celular con su posterior secreción al medio extracelular<sup>27</sup>. El grupo de pacientes sometido a herniorrafia inguinal mediante raqui-estesia mantuvo valores de Ac antiHsp70 estables antes y después de la intervención quirúrgica. Ello se explica por 2 vías diferentes pero simultáneas: por una parte, la anestesia epidural reduce el estrés intraoperatorio y con ello atenúa el empeoramiento postoperatorio la respuesta inmune<sup>28</sup>. Por otra, la cirugía poco invasiva que supone una herniorrafia inguinal, no altera la respuesta endocrina metabólica del estrés quirúrgico y reduce la respuesta inflamatoria y la supresión inmune<sup>29</sup>. En el grupo de pacientes sometidos a toracotomía bajo anestesia general, se objetivó una significativa disminución de la respuesta autoinmunitaria antiHsp70, que fue simultánea a la disminución del contenido de Hsp70 intracelular. En este grupo de pacientes expuestos a una mayor agresión quirúrgica, se produciría una inmediata HSR con síntesis de grandes cantidades de Hsps70 intracelulares y su liberación al torrente circulatorio con la consiguiente producción de autoanticuerpos antiHsp70. Los Ac tienden a concentrarse en el área de la agresión quirúrgica con una disminución de sus concentraciones plasmáticas<sup>26</sup>. Por otra parte, el aumento de los niveles de Hsp70 sérica, incrementaría la formación de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, disminuyendo la concentración de Ac antiHsp70i circulantes detectables<sup>30</sup> como se ha evidenciado en este estudio. Dicha disminución podría también reflejar un cierto estado de inmunosupresión tras una severa agresión<sup>31</sup>.

Los niveles séricos de IL-6 fueron significativamente superiores 24h después de las intervenciones quirúrgicas, con independencia de las técnicas anestésicas empleadas, lo cual coincide con otros trabajos<sup>32</sup>. Dado que la IL-6 juega un papel mayor en la respuesta de fase aguda y esta es similar en ambos grupos, y dado que en los pacientes sometidos a herniorrafia inguinal, cirugía mínimamente invasiva, no se ha podido demostrar la presencia de una HSR, podemos sospechar que la disminución tanto de los niveles postoperatorios de Hsps70 intracelulares como de autoAc circulantes antiHsp70 en pacientes sometidos a toracotomía, responden a una respuesta celular de estrés que estaría modulada por el grado y la intensidad de lesión, y no a la respuesta inflamatoria sistémica.

En resumen, cuanto mayor es la agresión quirúrgica, mayor es la disminución de Hsp70 intracelular en el postoperatorio inmediato. Dicha disminución es aún más importante en los pacientes con peor evolución postoperatoria, lo que ha llevado a proponer a la Hsp70 como marcador pronóstico postquirúrgico. La reducción del contenido intracelular de Hsp70 es paralela a la disminución de Ac antiHsp70, bien por la formación de inmunocomplejos circulantes, bien por su acúmulo en el área lesional y podría reflejar un cierto estado de inmunosupresión tras una severa agresión. El significativo incremento de IL-6 en ambos grupos de pacientes, los sometidos tanto a cirugía mayor como los sometidos a cirugía menor, nos permite concluir que la diferente respuesta al estrés quirúrgico no es debido a la respuesta inflamatoria sistémica sino a la respuesta de choque térmico.

### Financiación

Este trabajo ha sido financiado con una ayuda FIS 03/1308 y una ayuda de la Fundación Mutua Madrileña.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

A María Jesús Sánchez por su inestimable colaboración en el procesamiento de las muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kückükakin B, Gögenur I, Reiter RJ, Rosenberg J. Oxidative stress in relation to surgery: is there a role for the antioxidant melatonin? *J Surg Res.* 2009;152:338-47.
2. Cornelussen RN, Vanagt WY, Prinzen FW, Snoeckx LH. Proteins involved in salvage of the myocardium. *Adv Exp Med Biol.* 2003;543:277-91.
3. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80:183-201.
4. Brodsky JL, Chiosis G. Hsp70 molecular chaperones: emerging roles in human disease and identification of small molecule modulators. *Curr Top Med Chem.* 2006;6:1215-25.
5. Dybdahl B, Slørdahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart.* 2005;91:299-304.
6. Asea A. Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev.* 2006;2:209-15.
7. Herz I, Rosso R, Roth A, Keren G, George JH. Serum levels of heat shock protein 70 antibodies in patients with stable and unstable angina pectoris. *Acute Card Care.* 2006;18:46-50.
8. Moraca RJ, Sheldon DG, Thirlby RC. The role of epidural anesthesia and analgesia in surgical practice. *Ann Surg.* 2003;238:663-73.
9. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol.* 2008;15:118-46.
10. Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Nakamori Y, Noborio M, et al. Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis. *J Trauma.* 2001;51:1104-9.
11. Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:310-8.
12. Guisasaola MC, Ramos R, Fernández L, Suárez A, García-Barreno P. Proteínas de choque térmico en el estrés quirúrgico: toracotomía frente a herniorrafia. *Cir Esp.* 2004;75:350-5.
13. Cascales M. Estrés oxidativo. En *Proteínas del estrés y carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas.* Madrid. Spain: Instituto de España; 2002 p.88-99.
14. Ruzic B, Tomaskovic I, Trnski D, Kraus O, Bekavac-Beslin M, Vrkcic N. Systemic stress responses in patients undergoing surgery for benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 2005;95:77-80.
15. Voellmy R. Feedback regulation of the heat shock response. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;172:43-68.
16. Ogura H, Hashiguchi N, Tanaka H, Koh T, Noborio M, Nakamori Y, et al. Long-term enhanced expression of heat shock proteins and decelerated apoptosis in polymorphonuclear leukocytes from major burn patients. *J Burn Care Rehabil.* 2002;23:103-9.
17. Boshoff T, Lombard F, Eiselen R, Bornman JJ, Bachelet M, Polla BS, et al. Differential basal synthesis of Hsp70/Hsc70 contributes to interindividual variation in Hsp70/Hsp70c inducibility. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:1317-25.
18. Pinot F, el Yaagoubi A, Christie P, Dinh-Xuan AT, Polla BS. Induction of stress proteins by tobacco smoke in human monocytes: modulation by antioxidants. *Cell Stress Chaperones.* 1997;2:156-61.
19. Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, Passek F, Dickhth HH, Northoff H. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. *J Appl Physiol.* 2000;89:704-10.
20. Xiao C, Wu T, Ren A, Pan Q, Chen S, Wu F, et al. Basal and inducible levels of Hsp70 in patients with acute heat illness induced during training. *Cell Stress Chaperones.* 2003;8:86-92.
21. Luo X, Zuo X, Zhou Y, Zhang B, Shi Y, Liu M, et al. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:R41, doi:[10.1186/ar2399](https://doi.org/10.1186/ar2399).
22. Stice JP, Knowlton AA, Estrogen NF, kappa B. And the heat shock response. *Mol Med.* 2008;14:517-27.
23. Milne KJ, Noble EG. Response of the myocardium to exercise: sex-specific regulation of Hsp70. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40:655-63.
24. Gong J, Zhang Y, Durfee J, Weng D, Liu C, Koido S, et al. A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use. *J Immunol.* 2010;184:488-96.
25. Triantafilou M, Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans.* 2004;32:636-9.
26. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296:301-5.
27. Asea A. Hsp70: a chaperokine. In: John Wiley & Sons Ltd. *The Biology of extracellular molecular chaperones.* West Sussex, UK, 2008:173-83.
28. Ahlers O, Nachtigall I, Lenze J, Goldmann A, Schulte E, Höhne C, et al. Intraoperative thoracic epidural anaesthesia attenuates stress-induced immunosuppression in patients undergoing major abdominal surgery. *Br J Anaesth.* 2008;101:781-7.
29. Kehlet H. Manipulation of metabolic response in clinical practice. *World J Surg.* 2000;24:690-5.
30. Pockley AG, Multhoff G. Cell stress proteins in extracellular fluids: friend or foe?. In: John Wiley & Sons Ltd. *The Biology of extracellular molecular chaperones.* West Sussex, UK, 2008:86-100.
31. Flohé SB, Bangen JM, Flohé S, Agrawal H, Bergmann K, Schade FU. Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins. *Shock.* 2007;27:494-502.
32. Dermitzaki E, Staikou C, Petropoulos G, Rizos D, Sifaka I, Fassoulaki A. A randomized study of maternal serum cytokine levels following cesarean section under general or neuraxial anesthesia. *Int J Obstet Anesth.* 2009;18:33-7.