

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN
DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP 70 Y HSP 27)
EN PULMÓN HUMANO Y TUMORAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María del Pilar Sandoval Correa

Bajo la dirección del doctor

Emilio Álvarez González

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1719-5

Estudio Inmunohistoquímico de la
Expresión de Proteínas de Choque
Térmico (HSP 70 y HSP 27) en
Pulmón Humano Normal y
Tumoral

M^a del Pilar Sandoval Correa

AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Emilio Álvarez (H.G.U. “Gregorio Marañón”)* por iniciarme, dirigirme y respaldarme en este proyecto.

Al *Dr. Luis Carretero (H.G.U. “Gregorio Marañón”)* por la recolección y diagnóstico de las muestras.

A la *Dra. M^a Luisa Herránz (H.G.U. “Gregorio Marañón”)* por transmitirme su amplia experiencia en el campo de la inmunohistoquímica.

A *Gregorio González (H.G.U. “Gregorio Marañón”)* por ayudarme en la parte estadística.

A *Luis López (H.G.U. “Gregorio Marañón”)* por el revelado del material fotográfico.

A todos los compañeros del *Departamento de Anatomía Patológica (H.G.U. “Gregorio Marañón”)* por estar a mi lado.

A la *Unidad de Banco de Tumores (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III)* por apoyarme durante los últimos meses.

A los compañeros de estudio y sobretodo amigos de la *Facultad de Ciencias Biológicas (U.C.M.)* por animarme en los momentos difíciles.

A mi *madre, hermano, familiares y amigos* por su paciencia.

Muchas gracias a todos

DEDICATORIA

A mi padre

ÍNDICE

I.- <u>Introducción</u>	1
1.1.- Etiología del Cáncer de Pulmón.....	1
1.2.- Terapéutica.....	8
1.3.- Factores Pronósticos.....	12
1.4.- Perspectivas.....	14
1.5.- Hipótesis de Trabajo.....	23
1.6.- Objetivos.....	26
II.- <u>Material y Métodos</u>	28
2.1.- Obtención del Material.....	28
2.2.- Fijación.....	29
2.3.- Procesamiento Básico.....	29
2.4.- Demostración de Antígenos Tumorales.....	30
2.5.- Características de los Anticuerpos Empleados.....	34
2.5.1.- Anticuerpo para la Demostración de HSP 27.....	34
2.5.2.- Anticuerpo para la Demostración de HSP 70.....	42
2.6.- Características de los Indicadores Pronósticos Histopatológicos.....	49
2.7.- Características del Estado de Supervivencia.....	60

2.8.- Valoración de los Resultados.....	61
2.9.- Análisis Estadístico.....	63
III.- <u>Resultados</u>	65
3.1.- <i>HSP 70 y HSP 27 en el Tejido Broncopulmonar Normal</i>	66
3.1.1.- <i>HSP 70 y HSP 27 en Tejidos Centrales</i>	66
3.1.2.- <i>HSP 70 y HSP 27 en Tejidos Periféricos</i>	76
3.2.- <i>HSP 70 y HSP 27 en el Tejido Broncopulmonar Neoplásico</i>	85
3.2.1.- <i>Marcadores Histoanatomopatológicos</i>	85
3.2.2.- <i>Estado de Supervivencia</i>	90
3.2.3.- <i>HSP 70 en el Tejido Broncopulmonar Neoplásico</i>	90
3.2.4.- <i>HSP 27 en el Tejido Broncopulmonar Neoplásico</i>	112
3.3.- <i>Diferencias de Inmunomarcaje entre Tejido Broncopulmonar Normal y Neoplásico</i>	136
IV.- <u>Discusión</u>	140
4.1.- <i>Análisis de los Procedimientos Técnicos Utilizados</i>	140
4.2.- <i>Características Biológicas de HSP 27 y HSP 70</i>	169
4.3.- <i>Análisis de los Resultados</i>	192

4.3.1.- <i>Expresión de Proteínas de Choque Térmico en Tejido Broncopulmonar Normal</i>	192
4.3.2.- <i>Expresión de Proteínas de Choque Térmico en Tejido Broncopulmonar Neoplásico</i>	203
V.- <u>Resumen y Conclusiones</u>	225
5.1.- <i>Resumen</i>	225
5.2.- <i>Conclusiones</i>	229
VI.- <u>Bibliografía</u>	232

I.-INTRODUCCIÓN

I.-INTRODUCCIÓN

Se estima que el cáncer que produce mayor mortalidad en zonas industrializadas tales como Estados Unidos y Europa es el de pulmón. En España, la mortalidad por cáncer de pulmón incrementa rápidamente entre los hombres en edades de 50 a 80 años. Sin embargo, su elevada incidencia está aumentando particularmente en mujeres y jóvenes durante los últimos años. ^{*(1,2)}.

1.1.- ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN:

La etiología y patogénesis de la enfermedad no son aún claras pero los datos epidemiológicos existentes apuntan básicamente a dos tipos de influencias que pueden ser importantes en el cáncer de pulmón: 1) factores ambientales; 2) factores genéticos. ^{*(3)}.

✠ Factores Ambientales

Sin duda, el factor ambiental más íntimamente relacionado con la etiología del cáncer de pulmón es el consumo de tabaco, factor al que por su alto peso etiológico dedicamos nuestra atención en la primera parte de este apartado.

Las investigaciones clínicas y de laboratorio han demostrado que el tabaquismo aumenta el riesgo de un fumador de morir de diversas enfermedades, siendo el número uno el cáncer. Entre los cánceres motivados por el tabaco, encabeza la lista el de pulmón, de manera que su índice es diez veces mayor en los fumadores que en los no fumadores. Así, la elevada incidencia del cáncer de pulmón en España, a la vez que en gran parte los países desarrollados, se puede explicar casi enteramente por el consumo de tabaco. La relación entre fumar y cáncer está demostrada, y se ve una asociación estadística constante entre la frecuencia del cáncer de pulmón y la cuantía del consumo diario de tabaco, la tendencia a inhalar el humo y la duración del hábito de fumar. **(2,3,4).*

Se estima que el consumo de cigarrillos es responsable del 85% de los casos de cáncer de pulmón entre los hombres y del 75% entre las mujeres; una media general del 83%. Además, el fumar provoca aproximadamente el 30% del total de las muertes por cáncer. Los estudios médicos han demostrado que en fumadores de más de 40 cigarrillos al día el riesgo de padecer la enfermedad es 20 veces más frecuente. Igualmente, se considera que el riesgo de muerte por cáncer de pulmón disminuye con cada año de abstinencia. Los estudios sobre personas que han dejado de fumar revelan que si se abandona el hábito durante 10 años, el riesgo disminuye igualándose al de los no fumadores. Por otro lado, los datos disponibles muestran que las mujeres, las personas mayores y aquellas que presentan problemas de salud son las que más dejan de fumar. **(2,3,4).*

En la década de 1940 el fumar se consideraba como algo inofensivo, pero a partir de entonces los epidemiólogos no tardaron en observar que el cáncer de pulmón, poco frecuente antes del siglo XX, había aumentado de forma considerable a comienzos de la década de 1930. Fue entonces, cuando algunas

organizaciones iniciaron estudios comparando las muertes de cáncer de fumadores con las de no fumadores durante un periodo de varios años. Paralelamente, los estudios experimentales con animales demostraron que muchas de las sustancias químicas contenidas en el humo del cigarrillo eran cancerígenas. En 1962, el gobierno científico de EE.UU analizó las pruebas de que disponía. Sus conclusiones quedaron incluidas en el informe general sobre sanidad de 1964, donde se afirma que *“fumar es un riesgo para la salud de suficiente importancia como para justificar la necesidad de acciones apropiadas para remediarlo”*. En consecuencia varias ciudades y estados comenzaron a tomar las primeras medidas encaminadas a erradicar este hábito. Seguidamente, y en Europa, la situación se desarrolló de modo similar. **(1,2,3,4)*.

Es bien sabido que el tabaco juega un significativo papel en la etiología del cáncer de pulmón, y aunque se trate de algo comúnmente conocido en la comunidad médica ¿son los pacientes conscientes de tal asociación?. Un estudio en el que se sometió a un completo cuestionario a un amplio grupo de pacientes revela que a pesar de todo, la mayoría de los individuos son conscientes de que fumar es un factor causante en el desarrollo del cáncer pulmonar. **(5)*.

El proceso por el que los productos químicos producen cáncer ha sido ampliamente estudiado. Algunos actúan como iniciadores. Solo requieren una única exposición, pero el cáncer no aparece hasta pasado un largo periodo de latencia y tras la exposición a otro agente denominado promotor. Los iniciadores producen cambios irreversibles en el *ADN*. Los promotores no producen alteraciones en el *ADN*, pero sí un incremento en su síntesis y una estimulación de la expresión de los genes. Su acción solo tiene efecto cuando ha actuado previamente un iniciador y lo hace de forma repetida. El humo del tabaco

contiene muchos productos químicos iniciadores y promotores. Pero la actuación del tabaco como promotor es tal, que si se elimina el hábito de fumar, el riesgo de padecer cáncer de pulmón disminuye de forma rápida. ^{*(6)}.

En el epitelio de fumadores se ha visto atipias e hiperplasias que pueden ser el inicio de un proceso cancerígeno. A veces, como en el carcinoma bronquioloalveolar, no hay una relación obvia con el hábito de fumar, pero si existe conexión con daños previos del parénquima pulmonar. ^{*(7)}.

La relación causa-efecto ha sido también analizada entre el humo del tabaco inhalado de forma pasiva y el desarrollo de tumores pulmonares. Algunos estudios publicados apuntan que en las parejas en las cuales uno de los cónyuges es fumador pasivo éste sufre mayor riesgo de cáncer de pulmón. Además, el índice de la enfermedad es mayor en hijos no fumadores de padres fumadores. ^{*(8,9,10,11,12)}.

Resulta biológicamente aparente que el humo del tabaco contribuye en la inducción del cáncer de pulmón en individuos no fumadores. Sin embargo, recientes hallazgos apoyan previas suposiciones a cerca de que la mayor parte del incremento observado a padecer cáncer de pulmón por individuos no fumadores pueda relacionarse con la errónea clasificación del estado de fumador, la inapropiada selección de controles, así como con ciertos factores relacionados con el estilo de vida y posiblemente también con la disposición hereditaria. El humo del tabaco, como un factor causante del cáncer de pulmón en no fumadores, puede seriamente dificultar el esclarecimiento de la etiología multifactorial de los tumores en pulmón. ^{*(13)}.

La reciente introducción de biomarcadores a estudios moleculares epidemiológicos ha proporcionado un medio de valoración del riesgo de padecer cáncer en relación con el tabaco. Diversos biomarcadores (interacción agente-DNA) para la susceptibilidad genética a padecer cáncer de pulmón han sido desarrollados y validados en estudios piloto que han demostrado su asociación con un incremento en el riesgo a padecer cáncer de pulmón. Por ejemplo, enzimas metabólicas responsables de la bioactivación y detoxificación de agentes medioambientales, reordenaciones cromosómicas y pérdida de la capacidad de reparar el ADN han sido demostrados en linfocitos periféricos humanos. Estos marcadores permiten una estimación de la variación inter-individual en respuesta a la exposición a carcinógenos y así la valoración del riesgo de cáncer. ^{*(6,14)}.

Múltiples causas medioambientales han sido implicadas en la etiología de la enfermedad. Quizás, los factores ambientales más ligados al riesgo de padecer cáncer de pulmón, después del ya mencionado consumo de tabaco, sean aquellos relacionados con la exposición profesional a ciertos productos. Así, la exposición a una serie de agentes industriales (níquel, cromo, carbón, asbesto, arsénico, hidrocarburos hemicíclicos, gas mostaza, amianto, clorato de vinilo, radón, etc.) es importante, aunque de menos extendida implicación, en el recuento de casos de cáncer de pulmón. ^{*(2,3)}.

Igualmente, la excesiva exposición a diversos tipos de radiaciones puede incrementar el riesgo de cáncer. La mayoría de los rayos terapéuticos y diagnósticos utilizados en medicina están ajustados para emitir la menor dosis posible evitando perjuicios y sin sacrificar la calidad de la imagen. Pero una excesiva exposición puede provocar cáncer de pulmón, en especial entre los fumadores. La radiación produce cambios en el ADN como roturas o

transposiciones cromosómicas en las que los cabos rotos de 2 cromosomas pueden intercambiarse. La radiación actúa como un iniciador de la carcinogénesis induciendo alteraciones que progresan hasta convertirse en cáncer después de un periodo de latencia de varios años. En este intervalo puede producirse una exposición a otros factores. *(2,3).

Las evidencias conocidas hasta la fecha sugieren que las nuevas características de estilo de vida pueden jugar un potencialmente importante, aunque variable papel, en la etiología del cáncer de pulmón. Así, debería hacerse énfasis sobre aquellos factores implicados en el desarrollo del cáncer pulmonar más recientemente identificados. Algunas preferencias de dieta como la ingesta de grasas pueden convertirse en elementos de riesgo. Por el contrario, un alto consumo de frutas y vegetales en la alimentación es protector, aunque no se ha encontrado ningún componente dietético único que sea preventivo. *(2,3,15).

Factores Genéticos

La genética podría jugar un papel en la aparición del cáncer de pulmón. Por ello, uno de los pasos más prometedores para conocer las causas de la enfermedad y lograr así, establecer un programa de control efectivo, sería identificar personas que estén genéticamente predispuestas a padecer la enfermedad. En tal intento, diversos investigadores centran sus esfuerzos y luchan por descifrar las posibles transformaciones genéticas vinculadas al desarrollo del cáncer pulmonar.

Las alteraciones genéticas en los tumores pueden presentarse como cambios en el contenido total del *ADN*, en cromosomas individuales, en genes aislados o en la expresión génica.

Dave BJ. y su equipo llevaron a cabo un análisis cromosómico sobre cultivos linfocitarios de una serie de pacientes de cáncer de pulmón. El estudio reveló la importancia de específicos cambios genéticos en la etiología de la enfermedad, además de observarse cierta relación entre algunas anomalías genéticas y determinados tipos histológicos dentro del heterogéneo grupo de tumores de pulmón. Así, demostraron que más del 15% de sus pacientes mostraban reordenaciones en los cromosomas 1, 3, 5, 7, 9, 12, 14 y 21 y tales aberraciones eran significativamente altas en los cromosomas 7, 9, 12 y 21. Además, la clasificación de los pacientes de acuerdo con los diferentes tipos histológicos considerados dentro del cáncer pulmonar mostró que las variaciones en los cromosomas 1, 7 y 9 dominaban el conjunto de cambios cromosómicos dentro de los carcinomas de pulmón de células no pequeñas. **(14)*.

De un modo similar, y en apoyo de una naturaleza genética de la enfermedad, se han descrito oncogenes que podrían conferir una susceptibilidad dominante en la herencia del cáncer de pulmón. El oncogen *c-myc* localizado en el brazo *q* del cromosoma 8 se ha relacionado con el carcinoma pulmonar de células pequeñas; paralelamente, el gen *k-Ras* se asocia a adenocarcinomas. **(16,17)*.

Por otra parte, la pérdida de heterocigosidad constituye un nuevo tipo de mutación en los tumores de pulmón. La pérdida de heterocigosidad parece suceder como consecuencia de deleciones intersticiales, pérdida de cromosomas o acontecimientos de recombinación mitótica aberrante. **(18)*.

Sobre la base de tales conocimientos, *Yokota J.* y sus colaboradores hallan pérdida de heterozigosidad en los cromosomas 3, 13 y 17 en carcinomas de células pequeñas y sobre el cromosoma 3 en adenocarcinomas pulmonares. ^{*(19)}.

También, se piensa que la pérdida de heterozigosidad puede tener su origen en el enmascaramiento de genes supresores de tumores localizados en la región afectada en el correspondiente homólogo. ^{*(20,21)}. Un gen supresor de tumores identificado como diana de mutaciones en diversos cánceres es *p53* (localizado en el brazo *p* del cromosoma 17). ^{*(22)}. Se cree que es un gen implicado en la proliferación celular normal durante el desarrollo y que codifica para una fosfoproteína nuclear con capacidad de unión al *ADN* que activa la transcripción. ^{*(23,24)}. No obstante, distintos grupos han encontrado suficientes casos de carcinomas primarios de pulmón que contienen mutaciones puntuales en *p53* como para sospechar de su implicación oncológica. ^{*(25,26)}.

A pesar del empeño demostrado para determinar la potencial utilidad clínica de las mutaciones o de sus productos como indicadores de la enfermedad tumoral, el problema continúa sin solución definitiva. Sin embargo, este campo representa una gran promesa para el desarrollo de nuevos marcadores pronósticos de utilidad para la determinación del comportamiento de la enfermedad.

1.2.- TERAPÉUTICA:

El tratamiento del cáncer de pulmón continúa siendo un importante desafío para la Medicina, y aunque se dispone de una información cada vez más amplia sobre

la biología tumoral, factores pronósticos, métodos diagnósticos, y a pesar de la incorporación de nuevos esquemas terapéuticos, no se ha conseguido disminuir de manera ostensible su mortalidad.

Las medidas terapéuticas tradicionales incluyen cirugía, radiación y quimioterapia. En la actualidad, otras técnicas están en fase de experimentación y plantean prometedoras perspectivas. ^{*(3)}.

La principal estrategia para el tratamiento curativo del cáncer de pulmón es la excisión del tumor mediante su resección quirúrgica. El tratamiento quirúrgico puede implicar desde resecciones más o menos limitadas hasta neumonectomías completas en los casos de máxima complejidad. ^{*(27,28,29)}.

A veces, la cirugía curativa no es factible, sin embargo puede ser beneficiosa para el alivio sintomático de ciertas situaciones como la obstrucción, o puede tener el objetivo de disminuir la masa tumoral para permitir una mejor respuesta al tratamiento quimio- o radioterapéutico. Así, en el 80% de los pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas (*NSCLC*) puede obtenerse un control loco-regional mediante tratamiento quirúrgico seguido de terapia de radiación. Las indicaciones para una terapia de radiación post-operativa incluyen márgenes comprometidos y/o ganglios mediastínicos positivos. ^{*(30)}. Del mismo modo, la administración de quimioterapia adyuvante puede reducir el porcentaje de metástasis distantes y prolongar la supervivencia en pacientes con *NSCLC* de estadiaje *II* quirúrgicamente resectado. ^{*(31)}. Por el contrario, el papel de la cirugía en el carcinoma pulmonar de células pequeñas (*SCLC*) es controvertido, y diferentes estudios han reportado su aplicación como terapia única, junto a radio-

o quimioterapia como tratamientos adyuvantes, o seguida de un tratamiento quimioterapéutico pre-operativo. ^{*(32)}.

En numerosas ocasiones, las radiaciones ionizantes, electromagnéticas o por partículas, constituyen una importante medida terapéutica a considerar. Así, la propiedad de la radiación de respetar hasta cierto punto los tejidos normales, permite el tratamiento de los tumores médicamente no operables debido a su localización próxima a órganos vitales o porque el tumor halla empezado a infiltrar estructuras adyacentes que no pueden ser sacrificadas. Sin embargo, la sensibilidad de los tumores a las radiaciones es muy variable, y se emplea con frecuencia como tratamiento paliativo o como coadyuvante a la cirugía en el pre- o postoperatorio. ^{*(33)}. De esta forma, el estado avanzado inoperable del *NSCLC* es usualmente tratado con radioterapia. Aunque, una minoría de tales pacientes puede lograr una supervivencia prolongada con métodos terapéuticos agresivos, la mayoría de casos con factores pronósticos adversos no obtiene un tratamiento curativo. Para estos casos, la paliación de los síntomas es el mayor propósito del tratamiento radioterapéutico. ^{*(34,35)}.

De forma paralela, y sin quitar protagonismo a las técnicas previamente definidas, la quimioterapia aplicada de modo principal o junto a la cirugía y radiación en la denominada terapia combinada, es otro de los procedimientos de los que afortunadamente dispone la Medicina para el tratamiento de tumores. ^{*(36,37)}. Existe multitud de fármacos anticancerosos empleados en quimioterapia caracterizados generalmente por su actuación interfiriendo la síntesis de *ADN*. De este modo, resulta lógico pensar que las células en división serán las más sensibles a la quimioterapia. Además, tal hecho nos ayuda a comprender por qué

este tipo de tratamiento en el *SCLC* es parcialmente efectivo, en contraposición a su efecto en el *NSCLC* en donde su carácter es solo paliativo. ^{*(38)}.

Sin embargo, y a pesar de la elevada sensibilidad de ciertos tumores a la quimioterapia, su fracaso ocasional es una realidad que se debe mayoritariamente a dos dificultades: a) La resistencia cruzada a múltiples drogas no relacionadas funcional ni estructuralmente; b) La toxicidad de los fármacos empleados. ^{*(39)}. No obstante, las técnicas que evitan o controlan tales problemas se han ido perfeccionando, y hoy en día los protocolos quimioterapéuticos utilizan varios fármacos, cada uno de los cuales es efectivo de forma aislada. ^{*(40,41,42)}. Así, se combinan drogas a dosis óptimas y con diferentes mecanismos de acción para evitar la aparición de resistencias cruzadas y reacciones tóxicas. ^{*(42,43,44,45)}.

No obstante, y a pesar del reconocimiento de la cirugía, radiación y quimioterapia como efectivos tratamientos oncológicos, en la actualidad nuevas investigaciones se siguen llevando a cabo con el fin de concretar cual es el programa terapéutico más adecuado para cada tipo y estadiaje de neoplasia pulmonar.

Asimismo, en los últimos años, se estudia la aplicación de nuevas estrategias, algunas de ellas prometedoras, en el tratamiento del cáncer de pulmón. Sin duda, la inmunoterapia y modulación de la respuesta biológica son algunos de los proyectos más ambiciosos.

1.3.-FACTORES PRONÓSTICOS:

El tanteo de variables con interés pronóstico, y su aprobación final, es un proceso largo y laborioso. Además, su estudio en el cáncer de pulmón se ha vuelto cada vez más complejo, pues conforme crece el número de tales factores pronósticos también se ha vuelto más difícil precisar su importancia relativa y su exactitud pronóstica. Los problemas previstos en este terreno de expansión rápida son los resultados antagónicos publicados por investigadores respetados y la falta de estandarización en las metodologías aplicadas. Sin embargo, y a pesar de todo, en la actualidad disponemos de parámetros clínicos, histopatológicos y moleculares que han sido ampliamente validados, y de otros que ofrecen sólidas expectativas.

Numerosos signos clínicos estimados en el momento del diagnóstico de pacientes con carcinoma pulmonar son examinados con el fin de ampliar la información que nos guíe hacia un pronóstico acertado. Así, edad, sexo, variaciones de peso, determinados síntomas (tos, hemoptisis, disnea, dolor de pecho, ronquera, sibilancias) y calidad de vida entre otros, han sido investigados como posibles cooperantes pronósticos, aunque con resultados no siempre homogéneos. **(28,30,46,47,48,49,50,51).*

Sin embargo, los datos referentes al tamaño del tumor (T) y su extensión ganglionar (N) son sin duda los indicadores anatómicos de más confianza estimados para evaluar el pronóstico en los sujetos con neoplasias pulmonares.

**(47,49,51,52,53,54,55,56).*

En el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (*NSCLC*) ambos elementos de estadificación han sido demostrados como eficaces indicadores en la evolución de la enfermedad. La estimación de un estado *T* avanzado junto a la presencia de múltiples ganglios linfáticos positivos sirve para identificar pacientes con alto riesgo de recidivas y pobres perspectivas de supervivencia. **(30,57)*.

Por otra parte, el tercer aspecto considerado en la estadificación del cáncer de pulmón (*M* o número de metástasis a distancia) solo constituye un importante factor pronóstico para la supervivencia a corto plazo en pacientes con *NSCLC* de estadiaje IV. **(58)*.

La información histopatológica extraída de los pacientes con cáncer pulmonar, también ha sido valorada en múltiples ocasiones, y los resultados revelan que algunas variables constituyen factores predictivos en la evolución de la patología tumoral. El tipo histológico, así como el grado de diferenciación neoplásico, son importantes índices a tener en cuenta en la emisión de informes médicos. **(28,49,51,53)*.

Por último, un estudio molecular empleando reconocidos marcadores puede resultar de gran ayuda para predecir el pronóstico de pacientes con cáncer pulmonar e instituir un programa terapéutico apropiado. Generalmente, se trata de marcadores que actúan en la base de determinados mecanismos neoplásicos, y su estimación a través de la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas y de biología molecular ha creado nuevas perspectivas en el campo de la oncología.

Así, son múltiples las proteínas antigénicas que actúan en diversos aspectos relacionados con la génesis y expansión de un tumor. Son entre otras: Proteínas que intervienen en el control del crecimiento y diferenciación celular {*Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)*, *erb-b2*, *c-erbB1*, *K-Ras*}; Proteínas de apoptosis {*p53*, *bcl-2*, *c-myc*}; Proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular {*ki-67*, *Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA)*}; Proteínas angiogénicas {*Factor VIII*} y Proteínas relacionadas con procesos de metástasis {*CD44*, *MRP-1/CD9*, *KA11/CD82*}. ^{*(16,17,53,59,60,61,62)}. Algunos de tales antígenos (ej.: *p53*, *k-Ras*, *bcl-2*, ...) son determinados como marcadores plenamente consolidados y deben ser descritos en los informes específicos de tumores pulmonares. Así, los carcinomas broncopulmonares de células escamosas muestran una elevada frecuencia de mutaciones en *p53*, alteraciones *k-Ras* son principalmente vistas en adenocarcinomas y el gen *bcl-2* es intensamente expresado en el 90% de los carcinomas pulmonares de células pequeñas y carcinomas neuroendocrinos de células grandes. ^{*(63)}. No obstante, otros índices están aún en fase de experimentación, pero su estimación como parte del protocolo de investigación ante el diagnóstico de neoplasias en pulmón es de interés para su aprobación o anulación final como indicadores pronósticos.

1.4.-PERSPECTIVAS:

La tendencia actual en la biología celular es el estudio tanto estructural como funcional de moléculas específicas que estén de alguna manera implicadas en la

actitud celular optada ante determinadas situaciones anómalas. Así, la patología celular podría constituir un estado de estrés en el que determinadas proteínas son sospechosas en las tareas de respuesta celular. Concretamente, muchos acaecimientos neoplásicos podrían manifestar la expresión de tales proteínas distinguidas en experimentos de inducción de tolerancia celular ante situaciones que en principio se consideran letales.

En este sentido, las “Proteínas de Choque Térmico” (*HSP*’s), también conocidas como “Proteínas de Respuesta a Estrés” (*Srp*’s), constituyen un amplio conjunto proteico que se localiza en prácticamente todas las células vivas desde procariotas hasta eucariotas. Al mismo tiempo, sus secuencias de aminoácidos están altamente conservadas a lo largo de la evolución, existiendo una estrecha similitud entre *HSP*’s de bacterias y humanos. ^{*(64,65)}.

Desde los inicios, se ha considerado que las *HSP*’s están presentes de forma constitucional en células normales, donde desempeñan importantes papeles en el metabolismo celular. Sin embargo, se postula que su síntesis se puede ver incrementada ante una gran variedad de condiciones de estrés medioambientales y fisiopatológicas ^{*(66,67,68)}.

Así, resulta importante el concepto de “acompañante molecular” (molecular chaperon) empleado para referirse a las *HSP*’s. Bajo condiciones fisiológicas normales, las proteínas de estrés son expresadas al menos a niveles basales. En tales circunstancias, las *HSP*’s parecen ser esenciales para la viabilidad celular debido a su papel en procesos esenciales, como plegamiento y ensamblaje de las proteínas nuevamente sintetizadas, translocación proteica a través de las membranas celulares y/o degradación. Sin embargo, ante una determinada

situación celular de estrés, las proteínas intracelulares preexistentes pueden sufrir desnaturalización e inactivación. Es en este momento, cuando las *HSP's* aumentan dramáticamente su expresión y síntesis para reconocer tales proteínas desnaturalizadas (proteotoxinas) y tras unirse a ellas, conducir las hacia la adquisición de una nueva estructura terciaria, oligomerización, translocación a distintos compartimentos intracelulares, o degradación lisosómica y secreción de los productos proteicos afectados. De este modo, se ha llegado a considerar a las proteínas de choque térmico como análogos de las enzimas reparadoras del *ADN*, jugando un papel similar en proteínas. **(69,70,71,72,73,74,75)*.

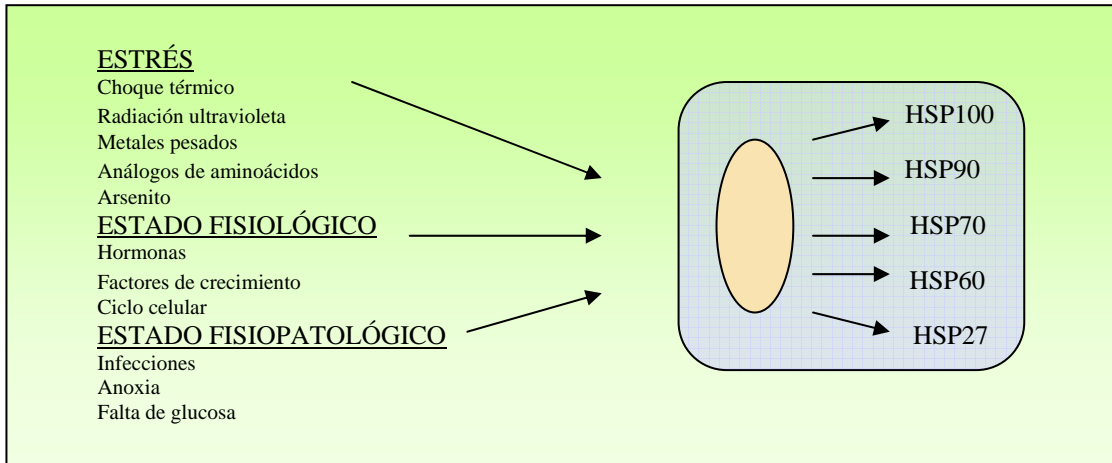
Los datos han sido corroborados en diversas ocasiones. La demostración en células *HeLa* sujetas a estrés metabólico de complejos estables entre *HSP's* y proteínas tanto nuevamente sintetizadas como maduras, constituye uno más de entre los múltiples estudios que confirman la actividad de las proteínas de estrés como acompañantes moleculares. **(76)*.

El estímulo capaz de provocar aumentos en la expresión de *HSP's* que primero fue descrito, y que además dio nombre a tales proteínas, fue la exposición celular a incrementos en su temperatura normal. Así, la respuesta de choque térmico quedó descrita hace casi 40 años (1962), cuando *Ritossa F.M.* observó en las glándulas salivales de *Drosophila* que una temperatura de 25-30°C inducía la expresión de determinados genes hasta entonces desconocidos. **(77)*. Los productos de este fenómeno fueron entonces identificados como un grupo de proteínas a las que se les nombró Proteínas de Choque Térmico, y lo que empezó como un curioso patrón de expresión dependiente de la temperatura en *Drosophila*, fue subsiguientemente descrito en todos los organismos desde procariotas hasta humanos. **(78,79,80)*.

Sin duda, la hipertermia se ha caracterizado por ser el inductor de proteínas de estrés mejor ilustrado a lo largo de los años. No obstante, ha resultado igual de trascendente la divulgación bibliográfica de otros muchos estímulos medioambientales capaces de generar del mismo modo una respuesta de estrés. Así, metales pesados, arsenito sódico, agentes sulfhidrilo, alcoholes, oxidantes, algunas drogas quimioterapéuticas y un largo etcétera, constituyen algunos de los múltiples estímulos implicados en acentuar la expresión de determinadas proteínas de estrés. **(81,82,83,84,85,86,87,88,89,90). (FIGURA 1).*

No obstante, en otras situaciones es posible ver también incrementada la expresión de *HSP's*. Se trata de aquellos estados de estrés generados como respuesta a determinados estímulos fisiológicos y/o patológicos. De entre tales desencadenantes se ha descrito igualmente una larga lista de candidatos, como son: exposición a algunas hormonas, determinadas fases del ciclo celular, ciertas infecciones virales y microbianas, situaciones de isquemia, estados de anoxia e hiperoxia, etc. **(91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101). (FIGURA 1).*

FIGURA 1:



Algunos estímulos que inducen la síntesis de *HSP's*.

No obstante, poco se sabe aún acerca de los mecanismos que conducen a una célula a incrementar sus niveles en *HSP's* ante determinados agentes y situaciones estresantes. En general, los inductores de proteínas de estrés son muy diversos y en principio, parecería lógico pensar que cualquier agente que contribuya a la generación de un perjuicio celular a través de mecanismos de desnaturalización proteica, podría ser considerado como un estímulo inductor de la síntesis de *HSP's*. *(102).

Muchos estímulos (peróxido de hidrógeno, etanol, anoxia, etc.) tienen en común su mecanismo de inducción de daño celular, mediante la perturbación del metabolismo oxidativo y el consecuente incremento en la producción de radicales libres de oxígeno, capaces de deteriorar numerosos componentes celulares. Pues bien, tal propiedad compartida entre muchos de los diversos inductores de proteínas de estrés considerados ha llevado a veces a admitir la vía

de estrés oxidativo como el desencadenante implicado en la inducción de la síntesis de *HSP's*. *(90,103,104,105).

Sin embargo, y del mismo modo, resulta igual de convincente sugerir que estímulos tan dispares como pueden ser el arsenito sódico y la hipertermia deben emplear diferentes mecanismos en la inducción de proteínas de estrés. La administración experimental de arsenito no provoca variaciones térmicas *in vivo*, lo cual lleva a elucidar que el arsenito sódico debe utilizar distintos procedimientos de inducción de *HSP's* a los que emplea el choque térmico. *(106).

De cualquier modo, es generalmente reconocido que la función de las proteínas de choque térmico no es otra que proteger a las células contra el subsiguiente estrés o aumentar la “habilidad” celular para recuperarse de los efectos tóxicos del mismo. Y en general, parece bastante asumido que las proteínas de estrés medien tal fenómeno de citoprotección y/o reparación celular a través de sus propiedades como acompañantes moleculares. *(107,108).

El efecto protector de las *HSP's* ha sido descrito frente a diferentes tipos de estrés, pero sin duda la primera función investigada para las mismas fue su participación en el fenómeno de Termotolerancia demostrado en numerosos sistemas incluyendo plantas, insectos, vertebrados y mamíferos. *(109,110,111,112,113). Así, es comúnmente aceptado que las células de todos los organismos responden a un pretratamiento de choque térmico no letal seguido de un periodo de recuperación activando un grupo específico de genes que codifican para *HSP's*. El fenómeno resulta en la supervivencia celular tras un subsiguiente y de otro modo tratamiento de choque térmico letal. *(114,115,116,117,118).

Numerosos experimentos reivindican rotundamente la participación de las proteínas de estrés en el fenómeno de termotolerancia. *Hendrey J. y Kola I.* mostraron que oocitos no fertilizados de ratón no eran capaces de sintetizar *HSP's*, siendo sensibles a 1 hora de incubación a 42°C. Sin embargo, si el *ARNm* de una determinada *HSP* era inyectado en tales células, se confirmaba un significativo aumento en su capacidad de tolerar elevadas temperaturas. **(119)*.

El hecho de que diversas proteínas de estrés sean un componente crítico en la termotolerancia ha sido demostrado en valiosos estudios en los que la inyección intracelular de anticuerpos anti-*HSP's* incrementó la susceptibilidad al choque térmico y células que sobreexpresan *HSP's* por métodos de transferencia genética son resistentes a la misma hipertermia letal. **(114,120)*.

Mediante experimentos *in vitro*, ha quedado demostrada la existencia de termosensibilidad en células eucariotas superiores, ante la inhibición de la expresión genética responsable de la síntesis de proteínas de choque térmico. Dicho de otro modo, el fenotipo termotolerante puede quedar reducido por bloqueo de la síntesis de *HSP's* a nivel de la transcripción genética. **(121)*.

Asimismo, el posible papel de las proteínas de estrés en la adquisición de termotolerancia fue sostenido por la incapacidad de un análogo del aminoácido prolina (azetidina), inductor de proteínas de estrés no funcionales, para transformar a las células en tolerantes. **(115)*. Los mismos efectos se han observado al inhibir la síntesis de proteínas de estrés con algunos agentes como la droga ciclohexamida. **(122)*.

Sin embargo, la participación de las proteínas de choque térmico en la obtención de termotolerancia ha sido cuestionada por similares procedimientos de estudio, que contrariamente han descrito la manifestación del fenómeno en presencia de ciertos agentes que inhiben la síntesis proteica ^{*(123,124)}. Mientras, otros autores postulan que aunque se demuestra un incremento en la resistencia térmica en células que expresan determinadas *HSP's*, tal expresión no es suficiente para el máximo desarrollo de termotolerancia. ^{*(125)}.

A veces, las cinéticas de desarrollo y decaimiento de la termotolerancia difieren de las cinéticas de algunas proteínas de choque térmico. ^{*(126)} *Landry J.* junto a su correspondiente equipo observan en células de hámster chino que la termotolerancia alcanza un máximo a las 5 horas tras su inducción, momento en el que el contenido en *HSP's* estaba solamente alrededor de la mitad de su máximo valor. Además, la cantidad de *HSP's* alcanzó su máximo a las 14 horas, cuando la termotolerancia estaba decayendo. ^{*(127)}.

Pese a manifiestos de este tipo, se asume que tras choque térmico, las *HSP's* se expresan siguiendo un patrón característico de inducción y represión, que depende del tipo de célula, de su estado de desarrollo-diferenciación, de los niveles preexistentes en la célula de proteínas de choque térmico previamente al estrés y de la intensidad, severidad y duración del estímulo. ^{*(115)}. Quizás, sea en tales variantes donde radican las escasas aunque existentes discrepancias halladas en cuanto a la implicación de las proteínas de choque térmico en el fenómeno de termotolerancia.

A pesar de las dificultades encontradas, las investigaciones han ido aún más lejos. Diversos estudios demuestran que la inducción térmica de *HSP's* protege

además frente a diversos agentes citotóxicos no térmicos como pueden ser radiaciones ultravioletas, isquemia, estrés oxidativo, endotoxinas, factores de necrosis tumoral, etc. Es lo que se ha llamado Tolerancia Cruzada y múltiples trabajos prueban la participación de las proteínas de estrés en tal sistema.

*(128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144).

De este modo, *Ryan A.J.* y sus colaboradores sometieron a un grupo de ratas a estrés térmico durante 24 horas antes de administrarles una inyección letal de lipopolisacárido bacteriano. Todos los animales sobrevivieron, en contraste a la administración de la endotoxina en ratas no tratadas previamente con calor, las cuales mostraron un elevado índice de mortalidad. *(145).

Poco después, *Villar J.* y su equipo demostraron el mismo efecto citoprotector para las *HSP's* inducidas térmicamente en un modelo de daño pulmonar agudo causado en ratas por la administración intratraqueal o inyección sistémica de la endotoxina fosfolipasa *A₁*. *(146,147).

Tan solo en contadas ocasiones, y en desacorde a tales pesquisas, se ha sugerido que cada tipo de estrés induce tolerancia exclusivamente a sí mismo. *Strand C.* y *Waddell TK.* junto a sus correspondientes equipos, no encontraron evidencias de que el choque térmico indujera tolerancia hacia el estrés mediado por situaciones de hiperoxia o isquemia. *(92,148). Sin embargo, la escasez de testimonios que justifiquen la inexistencia de un cruce de tolerancias ha puesto fin a publicaciones de este tipo.

Resultan innumerables los artículos bibliográficos dedicados a profundizar en la esencia de las proteínas de estrés y los fenómenos relacionados con ellas. Los

resultados son concluyentes y convergen en una sencilla afirmación: A nivel celular, la naturaleza ha creado un sistema que es capaz de que la célula y todos los organismos toleren situaciones de estrés que de otro modo podrían ser letales. Este mecanismo de defensa puede ser iniciado por una amplia variedad de estímulos tanto de tipo medioambiental como fisiopatológico. Y en términos generales, tal fenómeno se caracteriza en todos los organismos por la rápida y exclusiva síntesis de un pequeño grupo de proteínas intracelulares conocidas como Proteínas de Choque Térmico.

1.5-HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Resulta lógica la impaciente búsqueda de beneficios extraídos de las proteínas de choque térmico. Los intereses actuales se enfocan a acabar con todo tipo de cuestiones que quedan por ser respondidas a cerca de las funciones citoprotectoras que las citadas proteínas se cree que ejercen frente a diversas formas de perturbación celular. Sin embargo, su estudio en la patología como una situación de estrés ha despertado gran interés entre los investigadores y ha llevado a que trabajos de este tipo sean recientemente una prioridad.

Ciertamente, la respuesta de estrés es un mecanismo de defensa celular altamente conservado, definido por una rápida y específica expresión de proteínas de choque térmico que median la invulnerabilidad frente a diversas situaciones nocivas. Pues bien, se estima que si verdaderamente las *HSP's* constituyen tal mecanismo de protección, su aumentada expresión en determinadas formas de daño tisular como reflejo de una patología celular puede

tener un significado potencial, que de hecho ha servido para dar empuje a su estudio en diversas enfermedades humanas. **(90,113,149)*.

Sin embargo, desde que las proteínas de choque térmico han sido contempladas a elevados niveles en tejidos tumorales en comparación con los normales, numerosas investigaciones han dirigido sus esfuerzos a explorar su valor en trastornos de tipo oncológico. Y es que, muchas características de tales proteínas en cuanto a su función, expresión y regulación sugieren un papel en cáncer. **(150,151)*.

La implicación de las proteínas que nos ocupa en procesos neoplásicos ha llegado hasta el punto de que el grado de expresión de diferentes *HSP's* junto con el análisis de factores de valor pronóstico habitualmente estimados, puede ser significativo en los informes médicos emitidos a cerca de diversos procesos de carcinogénesis propios de tejidos como pulmón, mama, hígado, próstata, etc. **(152,153,154,155,156)*. A veces, incluso se ha sugerido que la expresión de ciertas proteínas de choque térmico puede ser un marcador pronóstico independiente en algunos tipos de tumores. **(157,158)*.

Apoyando tales suposiciones previas, nos hemos interesado por aquellos desórdenes que implican al pulmón, órgano considerado centro de atención en nuestro trabajo. De este modo, advertimos que son múltiples los modelos de inducción de proteínas de estrés los que median mecanismos de defensa y/o recuperación en células, estructuras y tejidos pulmonares. **(133,159,160,161,162,163)*. Es por referencias como estas por las que se sospecha que posiblemente las proteínas de estrés confieran protección en distintos modelos de perjuicio pulmonar. No obstante, y a pesar de la aparente importancia potencial de las

HSP's en desórdenes pulmonares, poco se sabe acerca de su abundancia, distribución y expresión tanto en pulmón humano normal como neoplásico.

Por todo ello, tales hechos son los que han motivado este estudio, bajo la hipótesis de que el cáncer de pulmón se ve afectado por fenómenos de sobreexpresión de algunas proteínas de estrés en comparación con el tejido pulmonar normal y que dichos cambios en los patrones de expresión guardan relación con distintos factores pronósticos considerados en este tipo de tumores.

Clásicamente, un elevado número de proteínas de masas moleculares entre aproximadamente 8 y 110 kD ha sido calificado como proteínas de choque térmico o *HSP's*. ^{*(80,113)} Tal grupo incluye diversas proteínas entre las que se encuentran algunos populares miembros como son la ubiquitina y la hemo-oxigenasa. ^{*(164,165)} Sin embargo, básicamente las proteínas de choque térmico se reparten en base a sus masas moleculares y homología de secuencias en: a) *HSP's* de alto peso molecular (Ej.: *HSP 100, 90, 70* ó *60*); b) *HSP's* de bajo peso molecular (Ej.: *HSP 27* y *HSP 25*). ^{*(79,166)}

Dada la extensa variedad de *HSP's* reconocidas hasta el momento y con la intención de simplificar y acotar nuestro estudio, el trabajo se centrará en dos familias concretas: *HSP 70* y *HSP 27*. Cada una, con sus características propias y exclusivas, además de las cualidades conjuntas a cualquier proteína de estrés, será analizada en el conjunto de las muestras pulmonares normales y neoplásicas consideradas para completar nuestra investigación.

1.6.-OBJETIVOS:

La presencia de antígenos consolidados como marcadores asociados a tumores, que además se pueden definir por anticuerpos monoclonales, es sin lugar a dudas uno de los principales avances en la inmunología tumoral y su aplicación pronóstica ha sido ampliamente difundida.

Existe gran cantidad de antígenos dentro del amplio rango de proteínas de choque térmico que podrían tener utilidad en el pronóstico de distintos tipos tumorales. Su investigación es relativamente reciente con respecto a la de otros marcadores neoplásicos firmemente reconocidos, pero no por ello menos importante.

Nuestras expectativas están dispuestas en 2 *HSP's* concretas (*HSP70* y *HSP 27*), que junto con la elevada incidencia del cáncer de pulmón y la mortalidad a la que da lugar es lo que nos ha motivado a poner en marcha este trabajo, fijándonos como objetivos:

- ❖ Determinar las expresiones de las proteínas de choque térmico *HSP 70* y *HSP 27* en el tejido broncopulmonar normal.
- ❖ Estudiar las expresiones de las proteínas de choque térmico *HSP 70* y *HSP 27* en el tejido broncopulmonar neoplásico.

- ❖ Establecimiento, si lo hubiera, de relación entre la expresión de las proteínas de estrés consideradas y parámetros histoanatomopatológicos de interés pronóstico en la evolución del cáncer de pulmón.

- ❖ Establecimiento, si lo hubiera, de relación entre la expresión de las proteínas de estrés consideradas y la supervivencia de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón.

II.-MATERIAL Y MÉTODOS

II.-MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.-OBTENCIÓN DEL MATERIAL:

El presente trabajo fue llevado a cabo empleando muestras de tejido pulmonar humano, procedente de resecciones quirúrgicas, pertenecientes a un total de 90 casos. 74 de los pacientes incluidos en nuestro estudio eran hombres y 16 mujeres.

Las resecciones fueron aplicadas en diferentes áreas broncopulmonares coincidiendo con la localización del tumor. Así, 26 muestras fueron extraídas del lóbulo superior del pulmón derecho, 24 de la misma región en el pulmón izquierdo, 6 del lóbulo medio derecho, 9 del lóbulo inferior también derecho y 11 del lóbulo inferior izquierdo. Además, 6 resecciones se aplicaron a nivel del bronquio izquierdo y 3 en el derecho. En 5 casos no se obtuvo referencias de los datos que nos informaran a cerca de la localización del tumor.

El material se recibió en fresco en el Laboratorio de Anatomía Patológica para ser inmediatamente tallado en pequeñas piezas (de aproximadamente 2x1x0'5 centímetros) que facilitara su manejo posterior.

2.2.-FIJACIÓN:

Seguidamente se procedió a la fijación del tejido. Para ello las muestras se dividieron en 2 partes cada una aplicándoles métodos de fijación distintos:

- (a) Muestras fijadas en Líquido de Carnoy (6 partes de etanol absoluto, 3 de cloroformo y 1 de ácido acético) durante dos horas.
- (b) Muestras fijadas en formaldehído al 10% durante aproximadamente 24 horas.

2.3.-PROCESAMIENTO BÁSICO:

El proceso de inclusión fue el siguiente paso tras la fijación. La inclusión se realizó a mano mediante deshidratación de las biopsias en sucesivos alcoholes de grado creciente y posterior aclaramiento en Ultraclear (un agente aclarante basado en una iso-parafina usada como sustitutivo del Xileno en los procesos de inclusión, desparafinado y montaje) (J. T. Baker, Mallinckrodt Services B. V., Rijsterborgherweg 20, P. O. Box 1,7400 AA Deventer, Holland) para finalmente embeber los tejidos en parafina.

Seguidamente se obtuvieron cortes de 3 a 4 micras de espesor sobre portas de poli-L-lisina dejándolos secar en estufa a 37°C durante 24 horas.

Previamente al inicio de la inmunotinción se desparafinaron los cortes sumergiéndolos en sucesivos baños del agente aclarante Ultraclear (3 pasos), alcohol etílico absoluto 99'9° (2 pasos) y alcohol 96° (2 pasos) hasta agua.

Se realizaron además, técnicas rutinarias de tinción con Hematoxilina y Eosina para el estudio de las características histológicas de los tejidos, empleando para ello los cortes fijados en formol de cada caso y con el fin de realizar el diagnóstico de la pieza y a los efectos del presente trabajo, de determinar el tipo histológico del tumor y su grado, así como el estadiaje anatomopatológico. El diagnóstico fue realizado por examinación de las muestras bajo microscopio óptico, clasificando los tumores de acuerdo con criterios bien definidos.

2.4.-DEMOSTRACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES:

Para este estudio se utilizaron dos anticuerpos, ambos monoclonales y dirigidos hacia la detección de dos proteínas de diferente peso molecular. Estos son:

1. Anticuerpo monoclonal para la demostración de la proteína de choque térmico de 70kD (HSP 70): (Laboratorios BioGenex 4600 Norris Canyon Road. San Ramon, CA 94583).

Sus características son:

- Anticuerpo monoclonal de ratón.
- Inmunoglobulina IgG1.
- Clon BRM-22.

- Presentación en forma prediluída.
- Especificidad: *HSP 73kD*/constitutiva y *HSP 72kD*/inducible.
- Patrón de distribución citoplásmico y/o nuclear.

2. Anticuerpo monoclonal para la demostración de la proteína de choque térmico de 27kD (*HSP 27*): (Laboratorios BioGenex 4600 Norris Canyon Road. San Ramon, CA 94583).

Sus características son:

- Anticuerpo monoclonal de ratón.
- Inmunoglobulina IgG1.
- Clon G3.1.
- Presentación en forma prediluída.
- Especificidad: *HSP 27* (24-27kD).
- Patrón de distribución citoplásmico.

Todos los datos referentes a los anticuerpos empleados quedan resumidos en la tabla I.

TABLA I:

MoAb	ESPECIFICIDAD	CLON	Ig	P. DISTRIBUCIÓN	LABORATORIO
<i>HSP70</i>	<i>HSP 73/HSP 72kD</i>	BRM-22	IgG1	Nuclear y/o Citoplásmico	BioGenex
<i>HSP27</i>	<i>HSP 27</i> (24-27 kD)	G3.1	IgG1	Citoplásmico	BioGenex

MoAb: Anticuerpo monoclonal. Ig: Inmunoglobulina. P. Distribución: Patrón de Distribución.

El análisis inmunohistoquímico de tinción para la demostración de los antígenos se llevó a cabo por la TÉCNICA STREPTAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA, un método indirecto en tres pasos.

Para la aplicación de esta técnica se utilizó un SISTEMA SUPERSENSITIVO DE DETECCIÓN (Laboratorios BioGenex, 4600 Norris Canyon Road. San Ramon, CA 94583).

La Técnica Streptavidina-Fosfatasa Alcalina queda definida en los siguientes pasos:

1. Desparafinación por inmersión sucesiva de los cortes en baños de agente aclarante y alcoholes de grado decreciente, como ya quedó descrito en el apartado anterior de “procesamiento básico”.
2. Hidratación en agua corriente.
3. Lavado en tampón PBS (Buffer Fosfato Salino) (Laboratorios Sigma Diagnostics. P. O. Pox 14508, ST. Louis, MO 63178 USA.).
4. Incubación con el anticuerpo monoclonal primario, durante una hora.
5. Lavado en tampón PBS.
6. Incubación con un suero secundario anti-ratón IgG biotinado, durante 30 minutos.
7. Lavado en tampón PBS.
8. Incubación con el complejo Streptavidina-Fosfatasa Alcalina durante media hora.

9. Revelado empleando Fast Red como cromógeno en sustrato naftol, bajo control microscópico y procediendo a detener la reacción en agua bidestilada en el momento en que el marcaje se consideró óptimo con la mínima tinción de fondo.
10. Ligera tinción nuclear de contraste con hematoxilina de Carazzi.
11. Montaje de los cortes en medio acuoso.

Todas las incubaciones realizadas en la técnica fueron llevadas a cabo en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Previamente a la incubación con el anticuerpo primario y con el fin de restablecer la antigenicidad que pudo quedar oculta en el proceso de fijación de las muestras, los cortes fueron sometidos a pretratamiento con microondas en buffer citrato a pH 6.0, 1M, durante tres pasos de 3 minutos cada uno.

Los datos más relevantes de la técnica empleada quedan resumidos en la tabla II.

TABLA II:

PASOS	CARACTERÍSTICAS	TIEMPOS
Pretratamiento	MO	3 pasos/3 minutos
MoAb	<i>HSP 70/HSP 27</i>	60 minutos
Ac.2°	Anti-ratón IgG biotinado	30 minutos
Ac.3°	Complejo Streptavidina-Fosfatasa Alcalina	30 minutos
Revelador	Cromógeno Fast-Red en sustrato naftol	Control microscópico

MoAb: Anticuerpo monoclonal. Ac2°: Anticuerpo secundario. Ac3°: Anticuerpo terciario. MO: Microondas.

2.5.-CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS EMPLEADOS:

2.5.1.-ANTICUERPO PARA LA DEMOSTRACIÓN DE HSP 27:

El antígeno *HSP 27* fue descrito inicialmente por *Edwards DP.* y su grupo a principios de los años 80. Se detectó en la línea celular *MCF-7* de cáncer mama en humanos. En un principio, fue reconocida como una proteína de 24 kD que respondía a estrógenos, aunque seguidamente mediante técnicas de secuenciación quedó demostrada su identidad con una proteína de choque térmico humana descrita en células *HeLa* y llamada *HSP 27*. **(167,168,169,170,171).*

Diferentes estudios sobre *HSP 27* la han correlacionado con la expresión del receptor de estrógenos (*RE*). Si bien, los estudios mas tempranos en células *MCF-7* ya sugerían que el antígeno se expresa constitutivamente y su síntesis se ve incrementada ante la exposición hormonal. **(167,168,169).*

Sin olvidar sus funciones citoprotectoras y como acompañante molecular comunes a otras *HSP's*, es importante mencionar el papel exclusivo de *HSP 27* en la organización del citoesqueleto. Tal actividad ha quedado demostrada al conocer su acción reparadora sobre los filamentos de actina que componen el propio citoesqueleto. Su localización intracelular coincidiendo con las zonas donde más polimerización y despolimerización de actina se exhibe, apoya la participación de la proteína de estrés modulando la polimerización de la misma.

**(172,173,174).*

Pero las investigaciones sobre *HSP 27* han ido centrándose cada vez más en las implicaciones clínicas que esta proteína pudiera tener en tumores. Su evaluación como un posible factor pronóstico para distintos procesos de carcinogénesis y en la respuesta a terapias antitumorales, ha sido objeto de muchos estudios con resultados en ocasiones contradictorios. ^{*(153,171)}. Así, la proteína *HSP 27* se intenta correlacionar a lo largo de la bibliografía con términos como tumorigenicidad, pronóstico, periodos libres de enfermedad, recidivas, supervivencia, etc. Al mismo tiempo, y con relación a su posible influencia en tratamientos anticancerígenos, la expresión de *HSP 27* ha sido vinculada a fenómenos de resistencia-sensibilidad a ciertas drogas quimioterapéuticas como la doxorubicina. ^{*(175,176)}.

Sin embargo, la trascendencia que la proteína de 27 kD pueda tener en los numerosos procesos biológicos y patológicos en los que se le ha implicado, sería incomprendible si no se profundizase previamente en sus características moleculares.

Así, los genes y secuencias complementarias de *ADN* que codifican para la proteína *HSP 27* han sido estudiados. Se sabe que, la proteína de estrés es codificada por al menos 3 genes estrechamente relacionados. Utilizando análisis de hibridación en células somáticas, *McGuire SE.* y sus colaboradores han mapeado estos genes humanos en los cromosomas 3, 9 y X. ^{*(177,178)}.

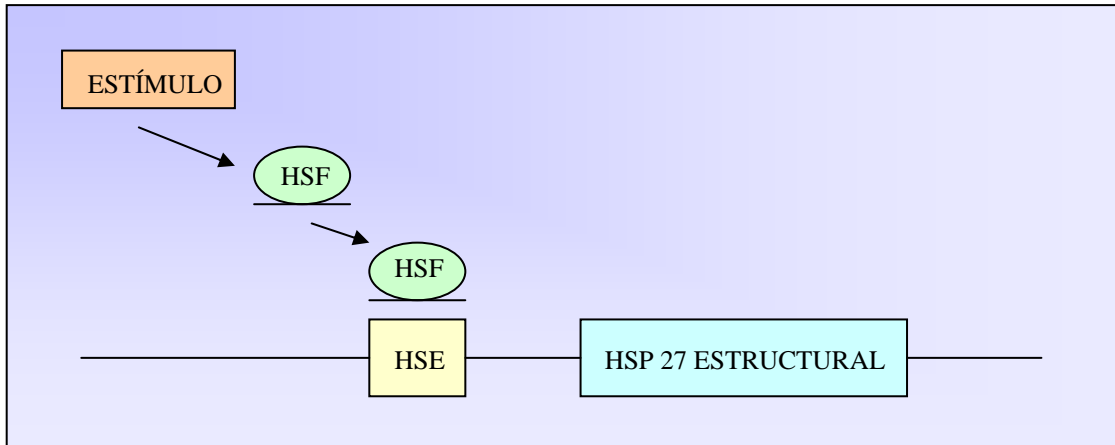
Algunos datos se conocen en cuanto a la regulación de los genes que codifican para las *HSP*'s. Así, se sospecha que tales genes contienen un motivo de *ADN* regulador conocido como Elemento de Choque Térmico (*HSE*). La secuencia *HSE* está definida por 5 nucleótidos que forman bloques contiguos nGAAn (n

denota los nucleótidos menos conservados) dispuestos en orientaciones alternativas (nGAAn o nTTCn). El elemento funcional incluye al menos 3 bloques y a veces se le llama Caja Pelham, después de que fuera *Hugh Pelham* quien descubriera primero esta unidad conservada. (FIGURA 1). Tal elemento se localizó en la zona upstream, por delante de la secuencia del gen que codifica para la proteína de choque térmico en cuestión. Por otra parte, *HSE* es el sitio de unión de Factores de Choque Térmico (*HSF*). Cuando *HSE* está desocupado, los genes son inactivos, y viceversa. Así, se sugiere que los factores de transcripción *HSF*, pueden actuar como sensores capaces de reconocer diferentes formas de estrés, y consecuentemente unirse a *HSE*. *(179,180,181,182,183,184,185). (FIGURA 2).

FIGURA 1:

5' NGAAN NGAAN NGAAN NTTCN 3'
Representativo elemento de choque térmico consistente en 4 repeticiones en tandem de unidades nGAAn y nTTCn.

FIGURA 2:



REGULACIÓN PROPUESTA PARA EL GEN *HSP 27*: Estímulo (fisiológico, estrés, fisiopatológico); *HSF* (Heat Shock Factor); *HSE* (Heat Shock Element).

Se ha propuesto que bajo condiciones de reposo, *HSF* está presente como un gran pool citosólico de monómeros inactivos. En respuesta a un estímulo causante de estrés *HSF* trimeriza, y se transloca al núcleo para unirse a la secuencia correspondiente de *ADN* en la región promotora del gen *HSP*. La última consecuencia será la producción de un rápido y alto nivel de transcripción correspondiente a la proteína de choque térmico. ^{*(186)}.

Sin embargo, poco conocidos son los mecanismos por los cuales las células “sienten” el estrés y subsiguientemente activan los factores *HSF*. Como todos los inductores de estrés conocidos pueden causar daño celular, es generalmente asumido que la acumulación citoplásmica de proteínas desnaturalizadas o plegadas de modo irregular, puede ser una señal para iniciar la respuesta al estrés.

^{*(102,113)}.

Por otra parte y en cuanto a lo que se refiere a la localización intracelular de *HSP 27*, esta ha sido estudiada por fraccionamiento celular, así como por técnicas de microscopía óptica y electrónica. Los resultados de estos estudios indican que la localización intracelular de la proteína *HSP 27* varía de acuerdo con el estado fisiológico de las células, y el tipo e intensidad del estrés al que puedan estar sometidas. **(187,188,189,190,191)*.

Así, *HSP 27* se halla predominantemente en la fracción celular soluble formada bajo crecimiento controlado en presencia de detergentes no iónicos. Sin embargo, tras tratamiento de choque térmico, la proteína se localiza mayormente en la fracción insoluble. Mientras, otros agentes de estrés también inductores de *HSP 27* como el arsenito sódico, distribuyen la proteína en ambas fracciones, soluble e insoluble. La razón de la aparición de *HSP's* de bajo peso molecular en fracciones solubles o insolubles dependiendo del tratamiento, parece ser la agregación de las proteínas en grandes complejos por encima de 700kD de tamaño, los cuales son insolubles en presencia de detergentes. **(187)*.

A escala microscópica, las células no sometidas a estrés presentan *HSP 27* predominantemente en la región perinuclear, cerca del Complejo de Golgi. Pero, tras choque térmico, la proteína se localiza mayormente en el núcleo. **(187)*. Sin embargo, el arsenito sódico genera una respuesta diferente, y no estimula la entrada de *HSP 27* al núcleo. **(188)*.

Asimismo, se ha estudiado la localización de *HSP 27* en células *MCF-7* de cáncer de mama humano, de modo que la proteína ha sido hallada con una definida polaridad y a modo de gránulos en el citoplasma apical de las células analizadas. **(189)*. Esta localización apical también ha sido observada en células

del epitelio superficial del endometrio humano durante específicos días del ciclo menstrual. ^{*(190)}. En las células de Leydig del testículo de rata, *HSP 27* ha sido estudiada por microscopía inmunoelectrónica, y la proteína fue hallada también en la matriz citoplásmica, esta vez cerca de las cisternas del retículo endoplásmico. ^{*(191)}.

Esta variable distribución de *HSP 27* hace pensar que se trata de una proteína dinámica capaz de moverse libremente a través de diferentes espacios celulares. Sin embargo, su localización citoplásmica ha sido la más reconocida hasta ahora, creando cierta incertidumbre sobre su distribución en el compartimento nuclear.

Se han realizado muchos estudios sobre *HSP's* utilizando electroforesis en geles bidimensionales de proteínas marcadas con aminoácidos radioactivos y extraídas de células expuestas a choque térmico. Cuando esta técnica fue aplicada a células de mamíferos, diferentes isoformas en la región de las *HSP's* de bajo peso molecular fueron detectadas, y este patrón ha sido a veces interpretado como una evidencia de la presencia de distintas y nuevas *HSP's*, adicionando confusión en la literatura. El problema radica en que *HSP 27* es modificada a nivel postraducciona l vía fosforilación en serina, y entonces la proteína aparece en diferentes variantes isoeléctricas de acuerdo con el grado de fosforilación. Más específicamente, *HSP 27* fue identificada en diferentes estudios con puntos isoeléctricos variables dentro de un rango de 7 a 5, en donde las formas más altamente fosforiladas eran las más ácidas. Y es que, el tratamiento de choque térmico, así como otros agentes fisiológicos y condiciones de estrés, no sólo inducen la síntesis de *HSP 27*, sino también la rápida fosforilación de la proteína preexistente y nuevamente sintetizada, incrementando su estabilidad. Los mayores sitios de fosforilación de la proteína humana han sido descritos, y son serina-78 y serina-82. ^{*(174,187,192,193,194,195)}.

Las secuencias de aminoácidos de las *HSP's* en general son altamente conservadas a lo largo de la evolución, excepto para proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, las cuales presentan solo homología limitada. Este grupo de *HSP's* resulta ser más heterogéneo, y debido a que tienen pocas secuencias de aminoácidos similares en diferentes organismos, anticuerpos contra estas proteínas tienden a mostrar reactividad cruzada, aunque solo para especies estrechamente relacionadas. **(181)*.

Actualmente, existe gran variedad en cuanto a los anticuerpos que reconocen al antígeno *HSP 27*. El empleo de anticuerpos policlonales ha quedado en desuso desde el momento en que aparecieron los monoclonales. Así, la mayoría de los autores coinciden en la utilización de estos últimos. Los sueros comerciales incluyen entre otros los anticuerpos *C11, Hu 27, D5*, etc. **(157,175,196,197,198,199,200)*.

El anticuerpo monoclonal anti-*HSP 27* empleado en este trabajo ha sido obtenido por inmunización de ratones *Bab/c* con la proteína de “24kD” aislada del citosol de células *MCF-7*. Las células del bazo de los ratones inmunizados fueron entonces fusionadas con células de mieloma *NS-1*. La gran especificidad y alta afinidad de este anticuerpo han sido testadas por análisis Western Blots y su utilidad ha sido documentada repetidas veces. **(153,201,202,203)*.

El laboratorio que ha obtenido este anticuerpo monoclonal anti-*HSP 27*, lo ha designado para su utilización sobre secciones tisulares a través de la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, distintos anticuerpos para *HSP 27*, así como diferentes técnicas se aplican en los muchos estudios existentes para la demostración del antígeno. De este modo, análisis cuantitativos (biología

molecular) y cualitativos (inmunohistoquímicos) son compaginados a lo largo de la bibliografía. **(153,156,157,171,196,197,198,201,204,205).*

Por todo ello, y de acuerdo con el tipo de investigación que se desee realizar, las ventajas e inconvenientes de las técnicas disponibles, así como sus posibles adaptaciones, deben ser analizadas previamente. Y es que, los resultados obtenidos pueden verse influidos, y por lo tanto variar en base a los procedimientos técnicos empleados y los distintos anticuerpos aplicados. De este modo, el proceso de fijación de las muestras, el sistema inmunohistoquímico de detección empleado, las características del anticuerpo aplicado y otros muchos factores afectarán sin duda los patrones finales.

2.5.2.-ANTICUERPO PARA LA DEMOSTRACIÓN DE HSP 70:

Dentro del conjunto de las proteínas de choque térmico, y más concretamente incluida en el grupo de las *HSP*'s de alto peso molecular, se encuentra la familia *HSP 70*, implicada también en innumerables situaciones fisiológicas y clínicas. Así, se estima que el grado de expresión de *HSP 70* puede ser significativo en el pronóstico de diversas alteraciones patológicas. Por ello, las investigaciones dirigidas hacia una mejor comprensión de la elevada manifestación proteica hallada en tejidos tumorales están en auge. **(151,152,155,204,206,207,208,209,210)*.

Sin embargo, si algo ha caracterizado a este antígeno es su participación en procesos de interacción proteína-proteína. Muchos estudios relacionan a la proteína *HSP 70* con los productos del gen supresor de tumores *p53* a través de la formación de complejos de unión. **(25,207,211,212,213,214,215)*. No obstante, este no ha sido el único caso de interacción en el que se ha implicado a *HSP 70*. Otros estudios defienden que el gen *HSP 70* está envuelto en la interacción con el producto del oncogen humano *c-myc*. **(216,217,218)*.

La familia *HSP 70* incluye diferentes polipéptidos con un peso molecular comprendido entre 68-74kD. **(65)*. Sin embargo, en la mayoría de las células de mamíferos existen dos formas predominantes que difieren en su regulación a pesar del alto grado de homología que comparten **(219)*:

- *HSP 73*: Un abundante miembro de 73kD de peso molecular que es expresado constitutivamente. Se encuentra presente bajo condiciones

fisiológicas normales funcionando como acompañante molecular y no es inducido por tratamiento de choque térmico. ^{*(79,80)}.

- HSP 72: Un miembro de 72kD altamente inducible en situaciones de estrés y que aparentemente no es esencial para la supervivencia celular a 37°C. ^{*(79,80)}.

La familia *HSP 70* es dentro de las *HSP's* la más abundante, mejor caracterizada y la más conservada en la mayoría de las especies y a lo largo de la evolución. ^{*(79,80)}. Ha quedado demostrado que el alto grado de homología se encuentra en el extremo amino-terminal de la proteína. Tal región contiene actividad *ATPasa* (une *ATP*), mientras que el extremo carboxi-terminal es una región de reconocimiento de sustrato (une proteínas). De este modo, a *HSP 70* se le ha atribuido poseer actividad dependiente de *ATP* en el plegamiento, maduración y transporte proteico. ^{*(220,221,222,223)}.

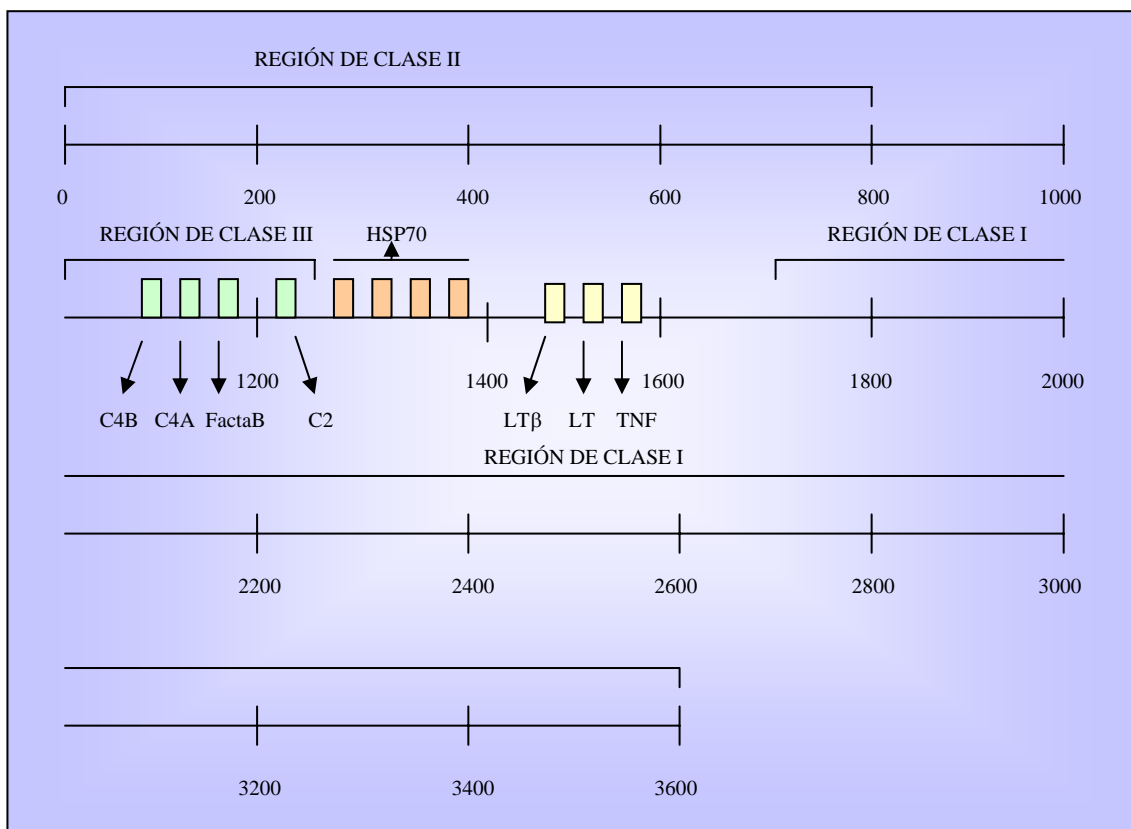
En condiciones normales la labor como acompañante molecular puede ser desempeñada por el miembro constitutivamente expresado y de peso molecular de 73kD. Por otro lado, la restauración de la estructura proteica normal tras una desnaturalización es un importante evento en la recuperación de las células del estrés, y aparentemente requiere la participación adicional de la forma inducible por calor de peso molecular de 72kD. ^{*(121)}.

HSP 70 es parte de una familia de multigenes. En humanos, al menos un gen que codifica para la proteína *HSP 70* ha sido mapeado en el brazo corto del cromosoma 6, junto al complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*) y entre el

loci para componentes del complemento y factores de necrosis tumoral. *(224).

(FIGURA 3).

FIGURA 3:



MAPA MOLECULAR QUE MUESTRA LA LOCALIZACIÓN DEL GEN *HSP 70*:

Localización en el cromosoma 6, entre los genes para las moléculas de clase II del *MHC* y los genes que codifican para citocinas (Linfotoxina (*LT*), Linfotoxina β (*LT* β) y Factor de Necrosis Tumoral (*TNF*)). Este mapa está simplificado excluyendo genes sin interés.

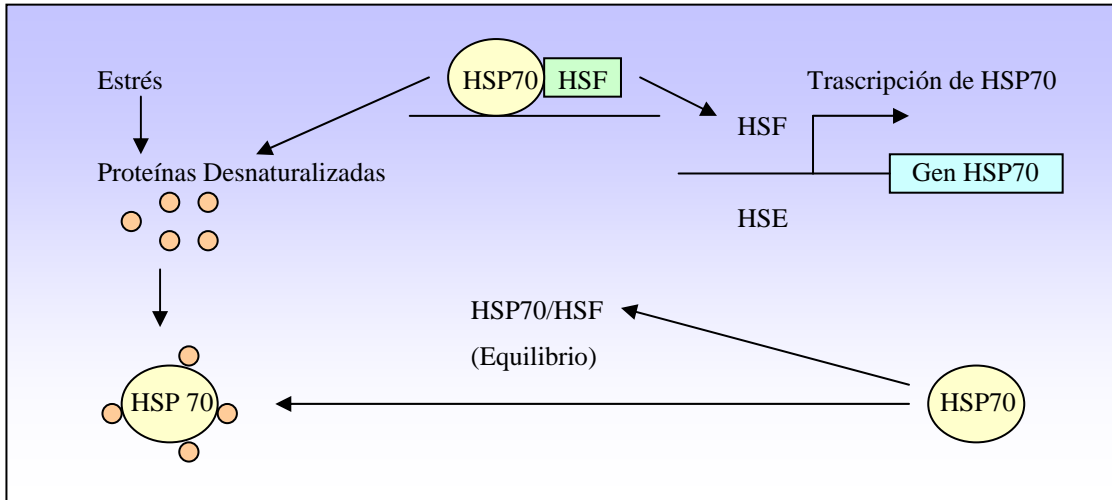
Una característica común para el conjunto de genes que codifican para las *HSP*'s parece ser claramente la presencia en la región promotora de un motivo de *ADN* específico (*HSE*), que es activado por determinados factores de

transcripción (*HSF*), como ya quedó expresado en el apartado anterior para el caso de la proteína *HSP 27*. ^{*(225,226)}. Sin embargo, la genética y regulación del gen/es de la familia *HSP 70* no parece estar aún clara y nuevos datos siguen apareciendo.

Como el procesamiento del *ARN* puede verse afectado durante el estrés celular, es digno de notar que los genes que codifican para *HSP 70* no contienen intrones. ^{*(227)}. Así, los mecanismos de regulación para la expresión de *HSP 70* están optimizados para obtener un alto nivel de expresión durante el estrés celular, de modo que: a) abundante *HSF* inactivo está presente basalmente pudiendo ser activado rápidamente; b) la necesidad para el procesamiento postranscripcional de *ARNm* es minimizada.

Con el fin de entender mejor la regulación de los genes que codifican para las proteínas *HSP's*, ha sido propuesto un modelo que defiende la existencia de cierta situación de equilibrio entre la proteína *HSP 70* y el factor *HSF*. Así, bajo condiciones normales *HSF* forma complejos con la proteína *HSP 70*, entonces *HSF* permanece inactivo. Durante el estrés las proteínas desnaturalizadas están unidas a pools intracelulares de *HSP 70*, causando una relativa depleción de la proteína de choque térmico libre. El decrecimiento del nivel intracelular de *HSP 70* rompe el equilibrio entre *HSF* y *HSP 70*, entonces se libera *HSF* que trimeriza, se transloca al núcleo y activa la transcripción de *HSP 70* vía unión de alta afinidad a *HSE*. Cuando *HSP 70* nuevamente sintetizada alcanza un nivel determinado, el equilibrio *HSF-HSP 70* es restaurado y la activación de *HSF* es atenuada. ^{*(102,113,228,229)}. (FIGURA 4).

FIGURA 4:



Modelo por el cual un estrés celular provoca proteínas dañadas y la consecuente activación de *HSF* (Factor de choque térmico) modificando el equilibrio entre *HSP 70* y *HSF*. *HSE* (Elemento de choque térmico).

En cuanto a lo que se refiere al patrón de distribución intracelular para el antígeno *HSP 70*, parece resultar bastante heterogéneo. Diferentes estudios han encontrado expresión de *HSP 70* en distintos compartimentos celulares. Así, se ha podido observar expresión nuclear, citoplásmica e incluso en superficie celular para las dos isoformas de la familia *HSP 70*. ^{*(151,210,230,231,232,233)}.

Diversos anticuerpos para el reconocimiento de la proteína *HSP 70* han sido aplicados a lo largo de la bibliografía, siendo casi siempre anticuerpos monoclonales, salvo algunas excepciones. ^{*(209)}. Así, la especificidad y utilidad del anticuerpo monoclonal para la demostración inmunohistoquímica de *HSP 70*, han sido documentadas repetidamente. Algunos ejemplos de estos anticuerpos son: *C92* (reconoce únicamente la forma *HSP 72*) y *N27* (reconoce las dos formas de *HSP 70*: *HSP 73* y *HSP 72*) ambos monoclonales. ^{*(152,207,234)}.

El anticuerpo monoclonal anti-*HSP 70* empleado en este trabajo ha sido obtenido por tecnología convencional a partir del inmunogen *HSP 70* de cerebro bovino. La especificidad de este anticuerpo quedó establecida por Westers Blots para las dos formas de *HSP 70* (constitutiva e inducible). El suero fue designado para la localización específica de la proteína de choque térmico en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, procedimiento técnico desarrollado en este trabajo. El anticuerpo marca positivamente la proteína de estrés *HSP 70* en secciones tanto de tejido normal como con alguna patología. Así, se ha comprobado su marcaje, el cual resultó ser citoplásmico y/o nuclear en diferentes situaciones como carcinomas de mama, tumores cerebrales o alteraciones hepáticas. **(90,235,236)*.

Además de diferentes anticuerpos monoclonales para *HSP 70*, diversas técnicas han permitido demostrar la presencia del antígeno. Así, anticuerpos y técnicas se combinan para obtener los mejores resultados. Las técnicas llevadas a cabo en los estudios revisados incluyen entre otras:

- Técnicas de inmunofluorescencia, a veces acopladas a sistemas de citometría de flujo. **(151,210,233,237)*.
- Análisis Northern Blots (*ARNm*), Southern Blots (*ADN*) y Western Blots (proteína). **(91,147,158,210,238)*.
- Técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas; estas últimas a partir de tejidos embebidos en parafina o sometidos a congelación. **(90,152,239)*.

La combinación de anticuerpos y técnicas, junto a la gran variabilidad de procedimientos a la hora de su aplicación, puede ocasionar conclusiones significativamente variables. Como ya quedó expuesto en el apartado anterior referido a la proteína *HSP 27*, esta combinación deberá ser evaluada al inicio de cualquier trabajo relacionado y con el fin de evitar resultados no deseados.

2.6.-CARACTERÍSTICAS DE LOS INDICADORES PRONÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS:

Los parámetros anatomopatológicos que deben estudiarse en cualquier paciente diagnosticado de cáncer pulmonar son: el tamaño del tumor, la presencia o ausencia de ganglios linfáticos afectados, así como el tipo histológico y grado de la neoplasia. Como consecuencia del análisis de estos datos se establece el estadiaje patológico del tumor según el sistema de clasificación *TNM*.

(a) Tamaño del Tumor:

El conocimiento de la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico es crucial para la evaluación precisa del pronóstico, así como para el estudio epidemiológico del tumor. El tamaño del tumor (*T*) constituye el primer parámetro considerado para su estadificación. Así, las neoplasias pulmonares son catalogadas bajo exámenes exhaustivos que recojan toda la información relacionada con la masa tumoral. En consecuencia, los tumores de menor volumen quedarán reunidos en los valores *T* más simples correspondientes a una jerarquía perfectamente definida. Mientras, las neoplasias de mayor tamaño y extensión pulmonar serán incluidas en los niveles *T* de mayor complejidad.

Muchos estudios han documentado la relación entre el tamaño de la masa tumoral y las expectativas de supervivencia. Los tumores de mayor volumen, independientemente del estado de los ganglios, se acompañan de los índices de supervivencia menos alentadores. *(240,241,242).

(b) Metástasis a Ganglios Linfáticos Regionales:

La afectación de ganglios linfáticos regionales diagnosticada sobre bases histopatológicas es un factor pronóstico importante en el cáncer de pulmón. Las regiones bronquial y traqueal, así como la mediastínica, son las principales áreas de drenaje linfático de las neoplasias pulmonares, y el ataque ganglionar constituye un marcador excelente de la posibilidad metastásica de un tumor. Por ello, resulta fácil entender que el segundo parámetro considerado en la estadificación de tumores pulmonares (*N*) se refiera a la afectación ganglionar. Bajo tal concepto, los carcinomas *N0* describirán la ausencia de metástasis a los ganglios linfáticos regionales en tanto que las categorías superiores (*N1*, *N2* y *N3*) recogen los casos con afectación ganglionar advirtiendo al mismo tiempo sobre la localización aproximada de tales ganglios.

La afectación ganglionar constituye un importante factor que condiciona la supervivencia. Múltiples artículos se han hecho eco de tal afirmación. El pronóstico global es muy satisfactorio en pacientes sin ataque ganglionar. En el caso de existir metástasis ganglionar el índice de supervivencia calculado es diferencialmente menor. ^{*(243)}. No obstante, aspectos concretos del involucramiento ofrecen informaciones adicionales de gran interés pronóstico. Así, el número de ganglios afectados y su ubicación son algunos de los parámetros que guardan relación con la supervivencia. ^{*(52,242,244,245,246,247,248)}.

(c) Tipo Histológico:

Una catalogación histológica correcta resulta imprescindible en un diagnóstico acertado y preciso de la enfermedad. Por ello, los tumores pulmonares

correspondientes a nuestra serie han sido cuidadosamente ordenados conforme a la gran variedad histológica definida en la última *Clasificación de la OMS para el Cáncer de Pulmón* (1999). La tabla III recoge de manera simplificada las neoplasias más representativas. (63,249).

TABLA III

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA OMS DEL CÁNCER DE PULMÓN		
A. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS	PAPILAR	
	DE CÉLULAS CLARAS	
	DE CÉLULAS PEQUEÑAS	
	BASALOIDE	
B. ADENOCARCINOMA	ACINAR	
	PAPILAR	
	CARCINOMA BRONQUIOLOALVEOLAR	MUCINOSO
		NO MUCINOSO
		MIXTO
	SÓLIDO CON FORMACIÓN MUCINOSA	
	MIXTO	
VARIANTES		
C. CARCINOMA ADENOESCAMOSO		
D. CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES		
E. CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS	CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS COMBINADO	
F. TUMOR CARCINOIDE	TÍPICO	
	ATÍPICO	

El *Carcinoma de Células Escamosas (Carcinoma Epidermoide)* es un tumor epitelial maligno que muestra queratinización y/o puentes intercelulares. La queratinización puede aparecer en forma de perlas escamosas o a modo de células individuales con citoplasma eosinófilo denso. La presencia de mucina intracelular en unas pocas células no excluye a los tumores de esta categoría.

Previa transformación metaplásica se desarrolla un carcinoma *in situ* para posteriormente convertirse en invasivo al atravesar la membrana basal. Por ello no es difícil encontrar el carcinoma *in situ* en la mucosa aérea adyacente.

En el pasado la mayoría de los carcinomas de células escamosas se localizaban centralmente en los bronquios segmentarios o subsegmentarios. Sin embargo, la incidencia del carcinoma de células escamosas en la periferia pulmonar está aumentando.

Los carcinomas de células escamosas pueden presentarse como variantes histológicas incluyendo los patrones *papilar*, *de células claras*, *de células pequeñas* y *basaloide*. Raramente estos patrones son observados en todo el tumor sino que más comúnmente se localizan de manera focal.

Los carcinomas de células escamosas son gradados como bien diferenciados si muestran queratinización, puentes intercelulares o formación de perlas de manera extensa. Se consideran como moderadamente diferenciados si estas características son fácilmente vistas aunque no de forma predominante. El carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado tiene solo características morfológicas focales de diferenciación escamosa; el componente remanente sigue usualmente un patrón de carcinoma de células grandes. Por otra parte la actividad mitótica es alta en los tumores pobremente diferenciados.

El carcinoma de células escamosas fue durante muchos años la variedad más frecuente de cáncer pulmonar. Sin embargo, en las dos últimas décadas el adenocarcinoma ha venido siendo reconocido como el tipo de cáncer pulmonar más común en algunas ciudades.

El *Adenocarcinoma* es un tumor epitelial maligno con diferenciación glandular o producción de mucina por las células tumorales mostrando un patrón de crecimiento *acinar, papilar, bronquioloalveolar* o *sólido con formación de mucina*. La mayoría de los adenocarcinomas pequeños (menos de 2cm de diámetro) muestran un patrón histológico uniforme. Sin embargo, los tumores de mayor tamaño presentan frecuentemente una histología *mixta* combinando los patrones anteriores.

En la mayoría de los adenocarcinomas donde hay una predominante presencia de mucina aparece un patrón de crecimiento papilar o acinar. Las células tumorales son poligonales con núcleo vesicular grande, nucleolo prominente y citoplasma moderadamente abundante.

En contraste con el carcinoma bronquioloalveolar los demás subtipos histológicos de adenocarcinoma (acinar, papilar, sólido y mixto) pueden presentarse desde un nivel bronquial hasta un nivel alveolar creciendo como una masa pulmonar endobronquial o periférica.

La gradación histológica de los adenocarcinomas según su nivel de diferenciación puede llevarse a cabo por la aplicación de criterios histológicos convencionales que reflejen las características estructurales y celulares del tumor.

El *Carcinoma Bronquioloalveolar* parece corresponderse con una entidad clinicopatológica diferente al del resto de los adenocarcinomas desde que es considerado el subtipo con mejor pronóstico. Muestra un patrón de crecimiento bronquioloalveolar puro sin evidencias de invasión estromal, vascular o pleural. Puede haber aumento en el espesor de la pared alveolar y un área central o

subpleural de colapso alveolar con incremento de fibras elásticas. El carcinoma bronquioloalveolar incluye dos subtipos histológicos. La variante *no mucinosa* se caracteriza por la presencia de células claras y/o neumocitos tipo II creciendo a lo largo de las paredes alveolares y sin invasión estromal. Por su parte el *carcinoma bronquioloalveolar mucinoso* se compone de células columnares altas, con aumento variable de la mucina citoplásmica, núcleo típicamente desplazado hacia la base de la célula, crecimiento a lo largo de las paredes alveolares y sin invasión estromal. En ocasiones es posible diagnosticar *carcinomas bronquioloalveolares mixtos mucinosos y no mucinosos* aunque se trata de una variedad histológica rara.

El *Carcinoma Adenoescamoso* es una forma compuesta que muestra componentes histológicos típicos del carcinoma de células escamosas junto a elementos característicos del adenocarcinoma. Se estima que cada componente debe comprometer al menos al 10% de todo el tumor.

El *Carcinoma de Células Pequeñas* constituye del 15 al 25% de todas las malignidades pulmonares. Es un tumor epitelial maligno de morfología neuroendocrina consistente en células pequeñas con citoplasma escaso, márgenes celulares mal definidos, cromatina nuclear finamente granular y nucleolo ausente o poco aparente. Las células pueden ser redondas, ovales o en forma de huso. Los núcleos son prominentes y el conteo mitótico alto (pueden contarse de 60 a 70 mitosis por 2 mm^2 (10 campos de elevado aumento) llegando a superar a veces las 200 mitosis por 2 mm^2 (10 campos de elevado aumento)). Las características morfológicas del carcinoma de células pequeñas permiten diagnosticarlo bajo microscopio óptico sin necesidad de demostrar la diferenciación neuroendocrina por microscopio electrónico o inmunohistoquímica.

El carcinoma de células pequeñas puede presentarse en bronquios grandes o en la periferia pulmonar. El epitelio bronquial puede quedar destruido aunque raramente es reemplazado. No es sabido que el carcinoma de células pequeñas sufra una fase preinvasiva como carcinoma *in situ* aunque la presencia de tal lesión puede ser a veces detectada en bronquios o bronquiolos adyacentes.

La gradación del carcinoma de células pequeñas es inapropiada desde que todos los carcinomas de células pequeñas son de elevado grado.

El carcinoma de células pequeñas constituye el tipo de cáncer pulmonar mejor diferenciado clínicamente. Así, sus características biológicas y de respuesta a quimioterapia permiten distinguirlo de la mayoría de los carcinomas de células no pequeñas.

Por su parte el *carcinoma de células pequeñas combinado* muestra un componente adicional que puede corresponderse con alguno de los carcinomas de células no pequeñas. Generalmente adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células grandes.

El *Carcinoma de Células Grandes* es el tipo neoplásico menos frecuente. Se trata de un tumor epitelial maligno indiferenciado que pierde las características citológicas de carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas. Así, el carcinoma de células grandes es diagnosticado por exclusión. Sin embargo, ultraestructuralmente es común hallar una mínima diferenciación escamosa o glandular. Las células tienen típicamente un núcleo grande, nucleolo prominente y moderado aumento del citoplasma. Unas pocas células pueden ser positivas para la mucina. Una variante de este tipo de

neoplasia es el *carcinoma neuroendocrino de células grandes*. Se trata de un tumor de elevado grado con patrones histológicos de tipo neuroendocrino a modo de trabéculas, orgánulos, rosetas o en empalizada.

El *Tumor Carcinoide* constituye menos del 5% de los tumores de pulmón. Es común diagnosticarlo sobre individuos jóvenes y aproximadamente el 20-40% de pacientes con tal tipo neoplásico son no fumadores. También se caracteriza por mostrar patrones de crecimiento que sugieren una diferenciación neuroendocrina (trabéculas, orgánulos, islotes, rosetas o en empalizada). Las células tumorales muestran características citológicas uniformes con citoplasma moderadamente eosinófilo y finamente granular. Los núcleos tienen un patrón de cromatina finamente granular. El nucleolo puede estar presente pero es más frecuente en los carcinoides atípicos. El número de mitosis es el criterio más importante a la hora de diferenciar carcinoides típicos de atípicos. El *carcinoide típico* tiene menos de 2 mitosis por 2 mm² de tumor viable (10 campos de elevado aumento) y pérdida de necrosis. Es una neoplasia de bajo grado que sigue un curso indolente. Muestra afectación de ganglios linfáticos regionales en más del 15% de los casos. Sin embargo, raramente metastatiza a distancia causando la muerte. El *carcinoide atípico* es un tumor de grado intermedio con 2-10 mitosis por 2 mm² (10 campos de elevado aumento) y/o con focos de necrosis. Esta última es una neoplasia potencialmente agresiva y su supervivencia es significativamente baja.

(d) Grado Histológico:

Los acontecimientos morfológicos y funcionales que tienen lugar en el grado de diferenciación del cáncer de pulmón son considerados con fines pronósticos. La diferenciación se refiere a la medida en que las células tumorales

parenquimatosas se parecen a las células normales homólogas. Así, los tumores bien diferenciados están compuestos por células que se parecen a las células maduras normales del tejido de origen de la neoplasia y los tumores pobremente diferenciados o indiferenciados tienen células de aspecto primitivo no especializadas.

Considerando tales referencias, cada tumor fue gradado en una escala subjetiva de I a III. El grado I se corresponde con las formas de máxima madurez y el grado III con las más indiferenciadas.

(e) *TNM-Estadiaje:*

Los carcinomas pulmonares de los que se compone nuestra serie fueron sometidos a la clasificación basada en el *Sistema Internacional de TNM para la Estadificación del Cáncer de Pulmón* de acuerdo con la extensión anatómica del tumor. Tal esquema de estadificación fue aprobado por el *AJCC (American Joint Committee on Cancer)* y la *UICC (Union Internationale Contre le Cancer)* en la última revisión de 1997. Así, el sistema se constituye como un método efectivo en la identificación de grupos de pacientes con similar pronóstico y opciones de tratamiento. *(250).

El régimen de estadificación es relevante para la clasificación de los 4 grandes tipos de cáncer de pulmón: carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas (incluyendo carcinoma bronquioloalveolar), carcinomas de células grandes y carcinomas de células pequeñas.

El sistema dispone que la letra *T* se refiere al tamaño del tumor, la *N* a los posibles ganglios linfáticos regionales afectados y la *M* a la presencia o ausencia de metástasis a distancia. Cada valor *TNM* se corresponderá con un estadio variable (0, I, II, IIIa, IIIb ó IV) en donde los estadios I reflejan los mejores pronósticos y los estadios IV los menos alentadores.

La correspondencia *TNM*-estadiaje queda reflejada en la tabla IV.

TABLA IV

ESTADÍO	TNM		
	T	N	M
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadío 0	TIS	Carcinoma <i>in situ</i>	
Estadío I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadío II	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Estadío IIIa	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1-T3	N2	M0
Estadío IIIb	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
Estadío IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

TAMAÑO DEL TUMOR:

TX Tumor demostrado por la presencia de células malignas en secreciones broncopulmonares, pero no visualizado.

T0 No hay evidencias de tumor primario.

TIS Carcinoma *in situ*.

T1 Tumor de 3cm o menos rodeado por pulmón o pleura visceral, y sin evidencias de invasión proximal a un bronquio lobar.

T2 Tumor de más de 3cm, o un tumor de cualquier tamaño que invada la pleura visceral o tenga asociada atelectasia o neumonitis obstructiva extendida a la región hiliar. En broncoscopia, la extensión del tumor demostrable debe estar en un bronquio lobar o al menos distar 2cm de la carina.

T3 Tumor de cualquier tamaño con extensión a la pared de la caja, diafragma, pleura mediastínica o pericardio sin envolver al corazón, grandes vasos, tráquea, esófago o cuerpo vertebral, o un tumor en el bronquio principal a 2cm de la carina sin implicarla.

T4 Tumor de cualquier tamaño con invasión del mediastino o que envuelva el corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral o carina, o presencia de efusión pleural maligna.

GANGLIOS LINFÁTICOS AFECTADOS:

N0 No hay metástasis demostrable a los ganglios linfáticos regionales.

N1 Metástasis a ganglios linfáticos en la región peribronquial o la hiliar.

N2 Metástasis a ganglios linfáticos mediastínicos laterales y ganglios linfáticos subcarinales.

N3 Metástasis a ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, ganglios linfáticos hiliares contralaterales, ganglios linfáticos escaleno lateral o contralateral o supraclavicular.

METÁSTASIS A DISTANCIA:

M0 No hay metástasis a distancia.

M1 Presencia de metástasis a distancia.

2.7.-CARACTERÍSTICAS DEL ESTADO DE SUPERVIVENCIA:

El estado de supervivencia constituye un importante factor a considerar en tanto que valora las consecuencias últimas en la evolución del tumor. Por ello y sin olvidar que la supervivencia es un parámetro dependiente del estadiaje neoplásico así como del tratamiento aplicado algunos datos han quedado reflejados de forma generalizada en algunos trabajos como resultado de extensos estudios estadísticos. (251). En 1999 se estimó que el cáncer de pulmón provocó el 17.8% de las muertes producidas por cáncer en el mundo. (252). En los últimos años tal valor se ha visto incrementado entre las mujeres. En Estados Unidos se estima que el cáncer de pulmón constituye el 25% de todas las muertes por cáncer entre las mujeres. (253). Las intervenciones médicas y quirúrgicas intentan en la medida de lo posible reducir estadísticas tan alarmantes. Sin embargo, la supervivencia del cáncer de pulmón es extremadamente pobre. Aproximadamente el 90% de los pacientes se ven afectados por la muerte a consecuencia del tumor. (254,255,256).

En el desarrollo de nuestro trabajo hemos considerado el resultado final tras el seguimiento médico de cada uno de los pacientes considerados. Cada caso fue catalogado según tres posibles estados de supervivencia: Vivo y libre de enfermedad, vivo y recidivante, o muerto.

2.8.-VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los resultados fueron evaluados en cada caso mediante la tabulación porcentual de las células positivas, especificando la intensidad de la reacción y su localización intracelular. Tales caracteres fueron analizados tanto en tejidos normales como tumorales. Además, los mismos criterios de tabulación fueron aplicados a la hora de valorar cada proteína de choque térmico considerada.

En todos los pulmones procesados se estudió:

- Localización del marcaje celular: Éste podría ser citoplásmico y/o nuclear. El marcaje correspondiente a la proteína *HSP 70* pudo ser visualizado en alguno de estos compartimentos celulares o en ambos a la vez. Sin embargo, la inmunotinción para el antígeno *HSP 27* se puso de manifiesto única y exclusivamente en el citoplasma celular.
- Intensidad de la reacción: Ésta fue fijada en una escala arbitraria y variable entre + (débilmente positiva), ++ (moderadamente positiva), +++ (fuertemente positiva), +/++ (débil-moderadamente positiva), ++/+++ (moderada-fuertemente positiva), +/+++ (débil-fuertemente positiva).
- Porcentaje de células marcadas: El número de células positivas varió desde un 5% hasta un 100%. Aquellos valores por debajo de un 5% fueron considerados como negativos (ausencia de células positivas). Y

para un valor del 100% se consideraba que todas las células eran positivas.

El análisis de estos caracteres se llevó a cabo a tres niveles histológicos en los tejidos normales encontrados:

- Parénquima periférico (neumocitos tipo I; neumocitos tipo II; macrófagos alveolares y capilares septales).
- Vías respiratorias finas (epitelio bronquiolar ciliado; células caliciformes; ...).
- Vías respiratorias gruesas, centrales o cartilaginosas (epitelio bronquial ciliado; células caliciformes; células glandulares serosas; células glandulares mucosas; células ductales; músculo bronquial;...).

Del mismo modo, considerando el porcentaje de células neoplásicas marcadas, la localización del marcaje celular y la intensidad de la reacción se elaboraron tablas que recogieran toda la información correspondiente a los tejidos tumorales.

Pero, con el fin de evaluar mejor la expresión de *HSP 70* y *HSP 27* en las muestras tumorales, junto a las tablas convencionales se elaboraron nuevas tablas a partir de la transformación de las primeras. De esta forma, se adjudicó valores de 0 a 3 para la intensidad del marcaje (0=negativo; 1=débil; 2=moderado y 3=fuerte), así como para el porcentaje de células positivas de cada caso (0=0% de células positivas; 1=<25% de células positivas; 2=26-50% de células positivas; 3=>50% de células positivas). La suma de ambos valores da un

máximo de 6 puntos, considerando aquellos valores entre 0-3 como negativos o de baja positividad y aquellos valores entre 4-6 como altamente positivos. Algunos casos son expresados como +/-, dependiendo de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. *(206,208).

Así, se construyeron cuadros para tejidos normales y tumorales que reflejaran todos los datos derivados de cada demostración antigénica (*HSP 70* y *HSP 27*).

2.9.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La estadística aplicada constituye un método de razonamiento que permite interpretar un conjunto de datos cuya característica básica es la variabilidad para poder obtener unas conclusiones con una seguridad conocida.

Los índices estimados como parte de la estadística descriptiva desarrollada son:

- Medidas de Centralización (Rango y Media aritmética).

- Medidas de Dispersión (Desviación típica).

A partir de tales datos establecemos una estadística analítica con el fin de establecer conclusiones relacionadas con una población desde los datos estudiados de una muestra.

Basándonos en la aplicación de un contraste de hipótesis establecemos como hipótesis nula (H_0) la ausencia de asociación entre la expresión de proteínas de choque térmico (*HSP 70* y *HSP 27*) sobre neoplasias pulmonares y los parámetros histopatológicos (tamaño, metástasis, tipo, grado, estadiaje) e índices de supervivencia considerados. Por el contrario, la hipótesis alternativa (H_1) plantea que los resultados observados no son atribuidos al azar.

En todo contraste de hipótesis debemos fijar a priori un grado de significación (p) que nos informe a cerca de la probabilidad máxima de que nuestros resultados sean debidos al azar. Es decir, a partir de que valor vamos a poder rechazar la hipótesis nula. El valor de significación aplicado en nuestro contraste de hipótesis es $p < 0.05$.

La elección del método analítico que debemos utilizar está determinada principalmente por los tipos de variables con los que se vaya a trabajar. En nuestro caso, nos decantamos por la aplicación del *Test Chi-Cuadrado* que nos permite analizar si existe alguna relación entre dos variables cualitativas. En aquellos casos en los que queramos determinar la influencia que un factor puede tener sobre los valores medios de una variable cuantitativa aplicaremos el *Test de Kruskal-Wallis*.

Sin embargo, es necesario advertir que la aplicación del *Test Chi-cuadrado* plantea dificultades de validez. Y es que, se estipula que si algunas de las casillas de la tabla de contingencia contienen una cantidad de individuos tan escasa que en la correspondiente tabla de frecuencias teóricas o esperadas aparecen valores esperados menores de 5 elementos la prueba de significación puede no resultar suficientemente fiable.

III.-RESULTADOS

III.-RESULTADOS

En este apartado estudiaremos de manera descriptiva los resultados derivados de la aplicación de los anticuerpos monoclonales seleccionados junto a la técnica inmunohistoquímica de tinción requerida. Así, llevamos a cabo el análisis semicuantitativo del marcaje correspondiente a los antígenos *HSP 70* y *HSP 27*. Al mismo tiempo, examinamos en cada muestra tanto el tejido tumoral como el tejido normal adyacente encontrado.

Seguidamente, una serie de tests estadísticos nos informarán a cerca de las posibles vinculaciones que puedan existir entre los datos valorados sobre los tejidos broncopulmonares neoplásicos y cada uno de los parámetros histoanatomopatológicos considerados. Del mismo modo, se examinaron las conexiones que pudieran relacionar las expresiones proteicas contempladas sobre las muestras tumorales con los índices de supervivencia estimados.

Por último, llevamos a cabo un estudio comparativo entre tejidos normales y tumorales que nos mostrara las similitudes o diferencias del marcaje encontrado y correspondiente a las proteínas *HSP 70* y *HSP 27*.

3.1.-HSP 70 Y HSP 27 EN EL TEJIDO BRONCOPULMONAR NORMAL:

El estudio inmunohistoquímico del tejido broncopulmonar normal se llevó a cabo en un total de 66 muestras para *HSP 70* y 70 para *HSP 27*. El resto de muestras hasta completar nuestra serie de 90 casos no abarcaba estructuras tisulares normales consideradas como representativas de la arquitectura broncopulmonar.

Los resultados del marcaje observado para cada proteína se expresan separando las estructuras tisulares que pertenecen a tejidos centrales (bronquios cartilagosos) de aquellas que corresponden a tejidos periféricos (regiones bronquiolo-alveolares).

3.1.1.-HSP 70 Y HSP 27 EN TEJIDOS CENTRALES:

En la tabla I queda representada la tinción obtenida en las células pertenecientes a los bronquios cartilagosos y estructuras relacionadas (tejidos centrales) tras la aplicación del anticuerpo anti-*HSP 70*. Además, queda reflejado el número de casos que resultaron ser positivos para el anticuerpo con respecto del total de las muestras analizadas, el porcentaje medio de células marcadas en cada estructura tisular, así como la intensidad de la tinción.

TABLA I

BRONQUIOS CARTILAGINOSOS Y ESTRUCTURAS ADYACENTES

	CÉLULAS EPITELIO BRONQ.	C.CALICI- FORMES	CÉLULAS BASALES	C.GLAND. SEROSAS	C.GLAND. MUCOSAS	C.DUCT.	C.DUCT. BASAL.	MUSC. BRONQ.
CASOS +/- N° TOTAL	13/14	0/14	3/14	5/13	4/13	10/14	0/14	6/10
%CÉLULAS MARCADAS	R: 10-100% ξ: 62.69% σ: 27.43%	0%	R: 20-80% ξ: 46.66% σ: 30.55%	R: 5-70% ξ: 33.00% σ: 24.39%	R: 15-100% ξ: 46.25% σ: 39.02%	R: 5-100% ξ: 35.00% σ: 29.34%	0%	R: 10-70% ξ: 35.83% σ: 25.38%
INTENSIDAD	6 + 2 ++ 1 +++ 0 +/- 3 ++/+++ 1 +/-/+++	-	1 + 0 ++ 0 +++ 0 +/- 2 ++/+++ 0 +/-/+++	4 + 0 ++ 0 +++ 1 +/- 0 ++/+++ 0 +/-/+++	3 + 0 ++ 0 +++ 0 +/- 0 ++/+++ 1 +/-/+++	5 + 1 ++ 1 +++ 2 +/- 1 ++/+++ 0 +/-/+++	-	6 + 0 ++ 0 +++ 0 +/- 0 ++/+++ 0 +/-/+++

Brong.: Bronquial; C.: Células; Gland.: Glandulares; Duct.: Ductales; Basal.: Basales; Musc.: Músculo; Casos+N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado tipo celular con respecto del total de casos en los que se encontró ese mismo tipo celular; % Células marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad del marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/- (débil-moderada), ++/+++ (moderada-fuerte), +/-/+++ (débil-fuerte).

En un total de 18 casos analizados para la proteína *HSP 70* se dispuso de áreas bronquiales útiles para su estudio.

El anticuerpo anti-*HSP 70* empleado pone de manifiesto la proteína correspondiente en células del epitelio ciliado bronquial. De los 14 casos en los que se describió este tipo de estructura 13 (92.9%) mostraron algún tipo de positividad. Siempre más de un 10% y hasta un 100% de células epiteliales aparecían marcadas. El porcentaje de células epiteliales teñidas por muestra se distribuyó con una media (ξ) del 62.69 % y una desviación típica (σ) del 27.43%. Así, se hacía evidente una substancial heterogeneidad en el marcaje de las

muestras para la proteína de estrés de alto peso molecular. 6 de los casos mostraron una intensidad de tinción débil, 2 una intensidad moderada, 3 intensidad variable de moderada a fuerte, 1 intensidad fuerte y 1 exhibió una intensidad altamente variable de débil a fuerte. El patrón de expresión fue citoplásmico y nuclear en 4 de las muestras marcadas y exclusivamente citoplásmico en 9 casos.

Otro tipo celular para el que se observó un elevado número de casos positivos (71.4%) fueron las células ductales de las glándulas submucosas. De los 14 casos que presentaban este tipo de estructura 10 mostraron marcaje. Sin embargo, el número de células que se mostraron teñidas varió ampliamente desde un 5% hasta un 100%. La ξ fue del 35% con una dispersión excesiva ($\sigma=29.34\%$). Por lo que se refiere a la intensidad del marcaje, 5 casos mostraron una intensidad de tinción débil, 2 intensidad variable de débil a moderada, 1 intensidad moderada, 1 intensidad moderada-fuerte y 1 intensidad fuerte. En 7 casos el patrón de expresión fue claramente citoplásmico, en 1 nuclear y en 2 citoplásmico y nuclear.

El músculo que acompaña a los bronquios centrales apareció marcado para la proteína *HSP 70* en el 60% (6/10) de las muestras que exhibían tal estructura. El porcentaje de células teñidas varió dentro de un rango entre 10% y 70% ($\xi=35.83\%$; $\sigma=25.38\%$). En la totalidad de los 6 casos positivos la intensidad de tinción fue débil. El patrón de marcaje fue conjuntamente citoplásmico y nuclear en la mitad de los casos. La otra mitad mostró el marcaje proteico limitado al compartimento citoplásmico. No se observó difusión exclusivamente nuclear en ninguna de las muestras.

Con respecto al resto de tipos celulares el número de casos positivos no resultó ser tan relevante. Es el caso de las células basales del epitelio bronquial y las células glandulares de las áreas submucosas. Incluso en algunos casos no se observó marcaje alguno como ocurrió en las células caliciformes del epitelio bronquial o las células basales de los conductos glandulares.

La foto 1 muestra a bajos aumentos algunos de los tipos celulares que aparecen marcados para la proteína *HSP 70* tales como las células ciliadas del epitelio bronquial teñidas con una intensidad fuerte, las glándulas submucosas débilmente marcadas, sus correspondientes conductos glandulares fuertemente positivos y el músculo bronquial con marcaje débil.

En la foto 2 se puede apreciar a mayor aumento la región glandular submucosa correspondiente a la foto 1 en donde se distingue marcaje para la proteína *HSP 70* sobre las glándulas serosas, mucosas e incluso de tipo mixto. Sin embargo, se trata de una tinción débil que nunca traspasa hacia el material mucoso. Véase también el marcaje pronunciado de las células que tapizan los conductos glandulares.

En la foto 3 se aprecia a elevado aumento el intenso marcaje de las células correspondientes al epitelio bronquial ciliado. Nótese en esta última fotografía la ausencia absoluta de marcaje en las células basales y células caliciformes del epitelio bronquial.

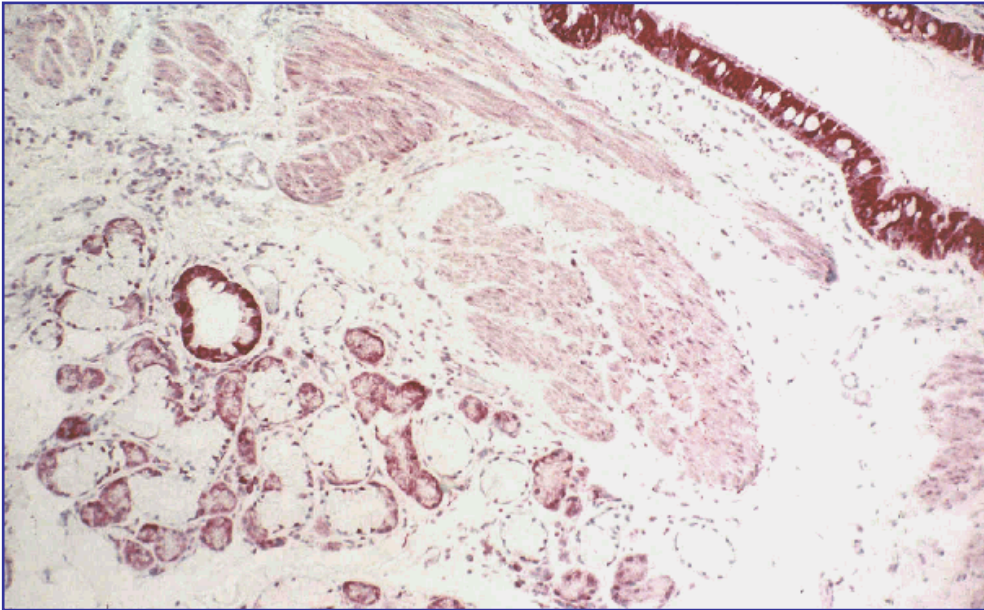


FOTO 1 (Aumentos: 10 x)

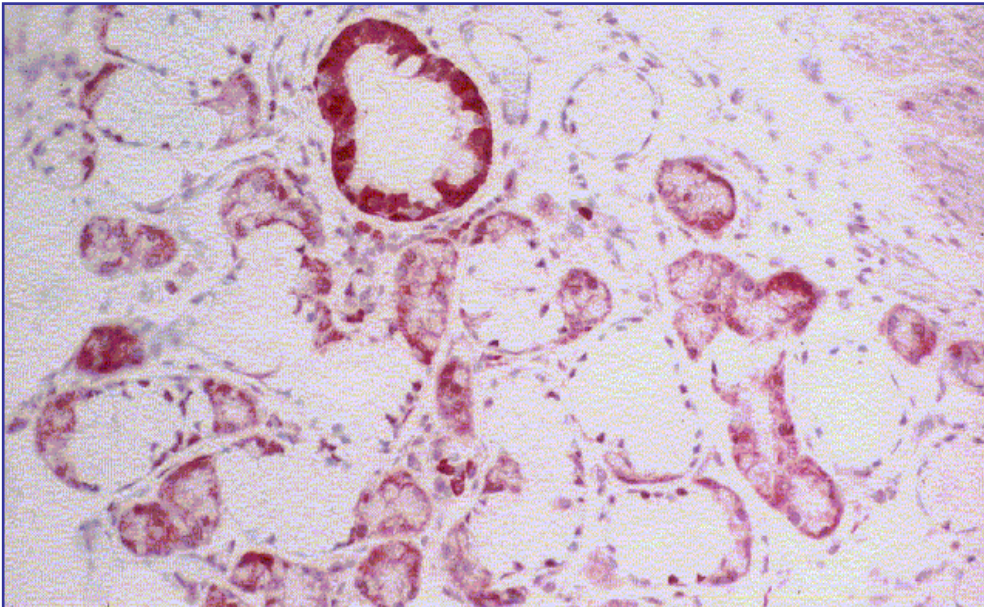


FOTO 2 (Aumentos: 20 x)

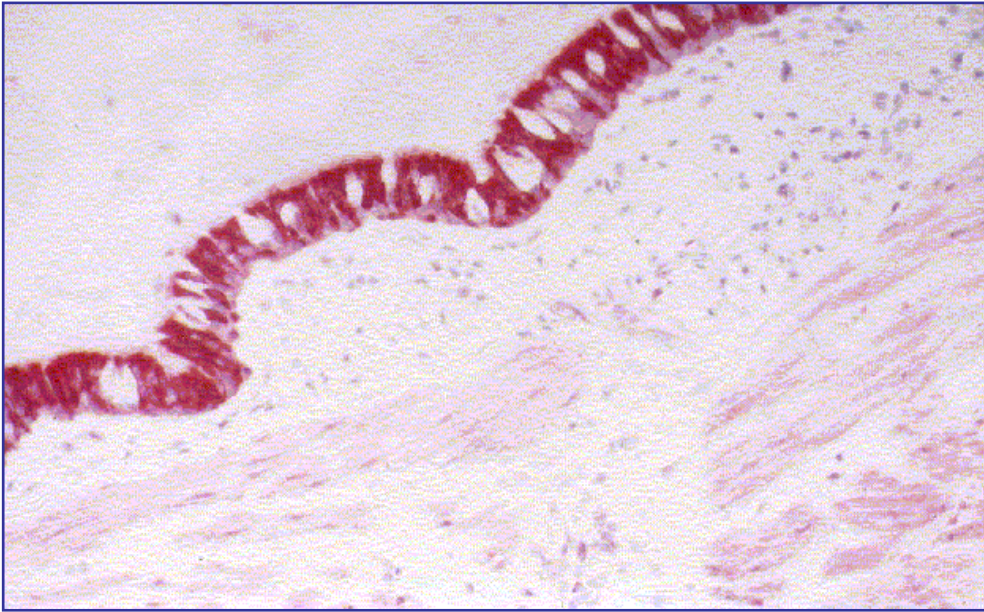


FOTO 3 (Aumentos: 20 x)

Para demostrar la proteína *HSP 27* estudiamos un total de 21 casos que mostraban algún tipo de estructura bronquial central. (TABLA II).

TABLA II

BRONQUIOS CARTILAGINOSOS Y ESTRUCTURAS ADYACENTES

	CÉLULAS EPITELIO BRONQ.	C.CALICI- FORMES	CÉLULAS BASEALES	C.GLAND. SEROSAS	C.GLAND. MUCOSAS	C.DUCT.	C.DUCT. BASAL.	MUSC. BRONQ.
CASOS +/- Nº TOTAL	2/21	0/21	12/21	2/14	1/14	6/14	1/14	10/13
%CÉLULAS MARCADAS	R: 10% ξ: 10.00% σ: 0.00%	0%	R: 5-70% ξ: 30.83% σ: 22.71%	R: 5-10% ξ: 7.50% σ: 3.53%	R: 10% ξ: 10.00% σ: 0.00%	R: 10-50% ξ: 30.83% σ: 18.00%	R: 80% ξ: 80.00% σ: 0.00%	R: 10-90% ξ: 56.00% σ: 29.51%
INTENSIDAD	1 + 1 ++ 0 +++ 0 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	-	9 + 1 ++ 1 +++ 1 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	2 + 0 ++ 0 +++ 0 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	1 + 0 ++ 0 +++ 0 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	3 + 0 ++ 1 +++ 2 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	0 + 0 ++ 1 +++ 0 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	5 + 4 ++ 0 +++ 1 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++

Bronq.: Bronquial; C.: Células; Gland.: Glandulares; Duct.: Ductales; Basal.: Basales; Musc.: Músculo; Casos+/Nº Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado tipo celular con respecto del total de casos en los que se encontró ese mismo tipo celular; % Células marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad del marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte).

Resulta interesante destacar la detección de marcaje para la demostración de la proteína *HSP 27* sobre las células basales del epitelio bronquial. 12 casos de los 21 (57.14%) estudiados resultaron positivos en tales células basales de las vías respiratorias gruesas ante la aplicación del anticuerpo anti-*HSP 27*. El porcentaje de células basales marcadas para la proteína de bajo peso molecular se distribuyó entorno a una media de centralización (ξ) del 30.83% con un índice de dispersión

excesivo ($\sigma=22.71\%$). La intensidad del marcaje quedó reconocida como débil en 9 de los 12 casos marcados. Además una muestra expresó la proteína de estrés con una intensidad variable de débil a moderada, 1 con intensidad moderada y 1 con intensidad fuerte.

Las fotos 4, 5 y 6 reflejan diferentes perspectivas de un mismo epitelio bronquial en el que sólo las células basales aparecen teñidas citoplásmicamente ante el estudio de la proteína de bajo peso molecular.

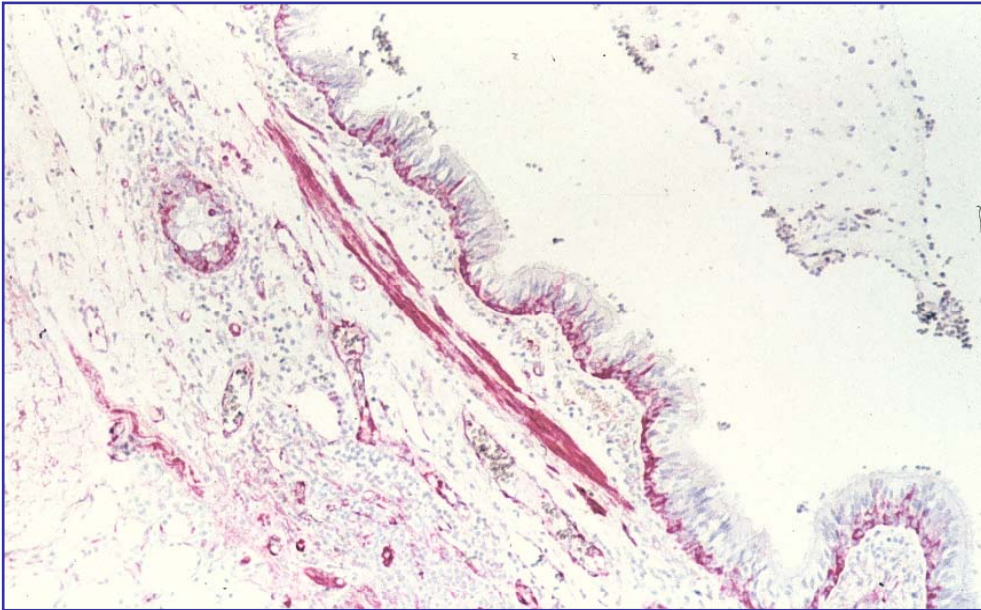


FOTO 4 (Aumentos: 10 x)

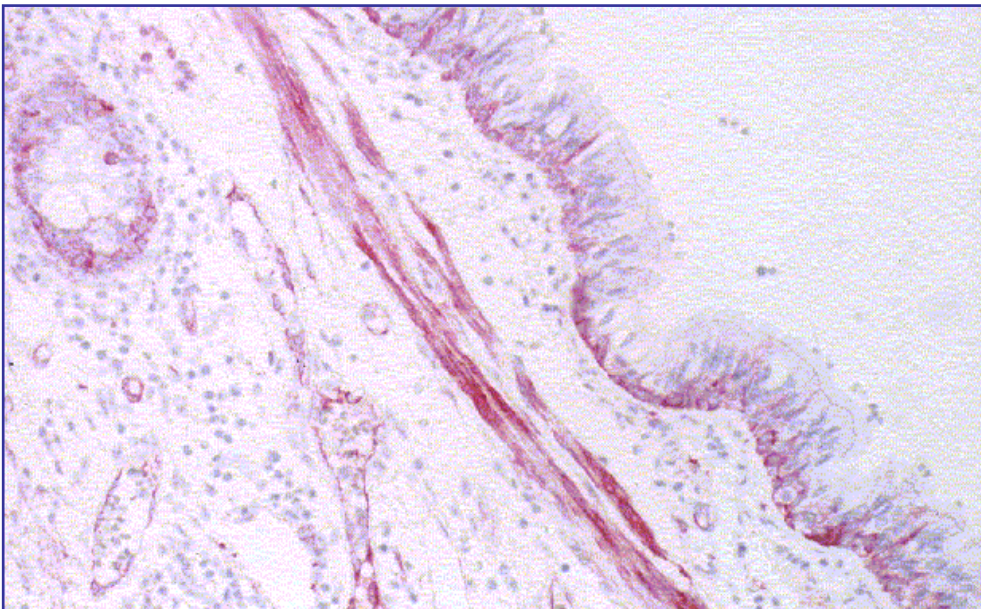


FOTO 5 (Aumentos: 20 x)

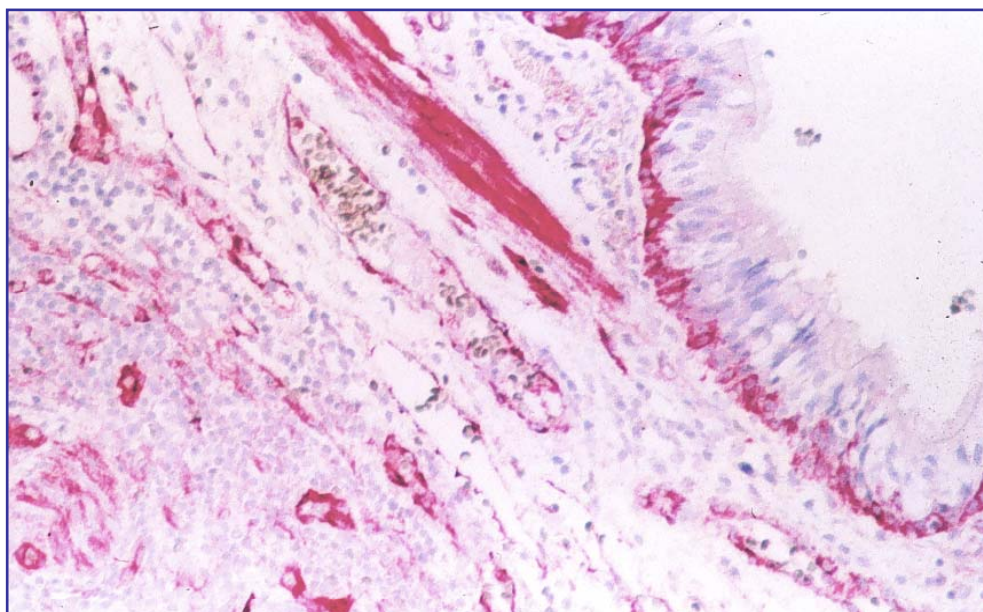


FOTO 6 (Aumentos: 20 x)

Las células ductales muestran también marcaje para la misma proteína de estrés. Un total de 6 muestras de las 14 (42.9%) que exhibían tal organización tisular quedaron marcadas para la proteína de bajo peso molecular. El índice de células marcadas se distribuye dentro de un rango del 10 al 50% ($\xi=30.83\%$; $\sigma=18\%$). La intensidad del marcaje varió ampliamente (3 casos expresaron la proteína *HSP 27* con una intensidad débil, 2 con intensidad débil-moderada y 1 con intensidad fuerte). Tales resultados advierten de un disminuido marcaje proteico correspondiente a *HSP 27* en las células ductales con respecto al descrito previa aplicación del anticuerpo anti-*HSP 70*.

Un nuevo hecho relevante en el estudio de la proteína *HSP 27* fue el elevado porcentaje de casos que mostraron positividad en el músculo bronquial. 10 de 13 casos (76.9%) mostraron tinción en el músculo con un porcentaje de células musculares marcadas dentro de cada muestra que varió ampliamente desde un 10 hasta un 90% ($\xi=56\%$; $\sigma=29.51\%$). La intensidad de la tinción se distribuyó en un rango de débil a moderado (5 casos mostraron intensidad débil, 1 débil-moderada y 4 moderada).

La localización del marcaje correspondiente a la proteína *HSP 27* fue siempre y en todas las estructuras citoplásmica.

3.1.2.-*HSP 70 Y HSP 27 EN TEJIDOS PERIFÉRICOS:*

Los datos referidos a este apartado y para la proteína *HSP 70* quedan reflejados en la tabla III.

TABLA III

ESTRUCTURAS BRONQUIOLO-ALVEOLARES

	CÉLULAS EPITELIO BRONQUIOLAR	CÉLULAS CALICI- FORMES	CÉLULAS RESERVA	N.TIPO I	N.TIPO II	MACRÓFAGOS ALVEOLARES	CAPILARES SEPTALES
CASOS +/- N° TOTAL	35/38	0/38	0/4	0/51	32/51	0/51	0/51
% CÉLULAS MARCADAS	R: 5-100% ξ: 49.85% σ: 25.04%	0%	0%	0%	R: 5-60% ξ: 18.59 % σ: 15.51%	0%	0%
INTENSIDAD	12 + 7 ++ 4 +++ 2 +/+++ 8 ++/+++ 2 +/+++	-	-	-	17 + 5 ++ 0 +++ 8 +/+++ 0 ++/+++ 2 +/+++	-	-

N.Tipo I: Neumocitos Tipo I; N.Tipo II: Neumocitos Tipo II; Casos +/-N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado tipo celular con respecto del total de casos en los que se encontró ese mismo tipo celular; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/+++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte).

En el estudio de 56 tejidos pulmonares periféricos la proteína *HSP 70* fue reconocida por su anticuerpo correspondiente en células del epitelio bronquiolar y neumocitos tipo II.

Así, 35 de los 38 (92.1%) casos en los que se identificó la presencia de vías bronquiolares manifestaron positividad epitelial. El porcentaje de células teñidas por muestra fue muy variable (desde un 5% hasta un 100%). Los índices de distribución ($\xi=49.85\%$; $\sigma=25.04\%$) sugieren que se trata de unos datos excesivamente dispersos. Por lo que se refiere a la intensidad de tinción 12 casos expresaron la proteína de alto peso molecular con una intensidad débil, 2 con intensidad débil-moderada, 7 con intensidad moderada, 8 moderada-fuerte, 4

fuerte y 2 con intensidad débil-fuerte. La tinción se catalogó como citoplásmica en 26 casos. 9 muestras manifestaron un patrón de distribución citoplásmico y nuclear.

El 62.7% (32/51) de los casos en los que se demostró la presencia de neumocitos de tipo II exhibió marcaje para *HSP 70* con un índice de células teñidas por muestra siempre inferior al 60% ($\xi=18.59\%$; $\sigma=15.51\%$). En la totalidad de los 32 casos positivos hallamos 17 con una intensidad de tinción débil, 8 débil-moderada, 5 moderada y 2 débil-fuerte. El patrón de expresión quedó restringido al núcleo en 7 casos en tanto que 13 muestras manifestaron una distribución citoplásmica. La tinción intracelular absoluta (citoplásmica y nuclear) la exhibieron 12 casos.

El resto de estructuras periféricas pertenecientes a la región bronquiolo-alveolar entre las que se encuentran las células caliciformes del epitelio bronquiolar, las células de reserva, los neumocitos tipo I, los macrófagos alveolares y las células que conforman los capilares septales resultaron ser siempre negativas para la proteína *HSP 70*.

Las fotos 7 y 8 ofrecen distintas panorámicas en las que un intenso marcaje ubica a la proteína de alto peso molecular sobre los epitelios periféricos.

Las fotos 9 y 10 representan detalladamente la fuerte intensidad con que *HSP 70* se expresa sobre las vías más finas.

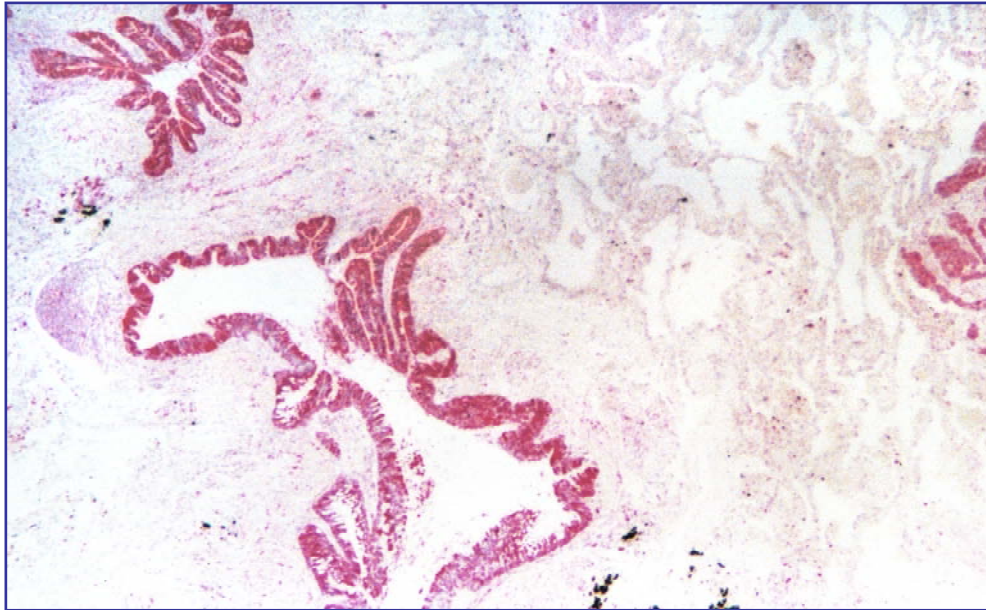


FOTO 7 (Aumentos: 4 x)

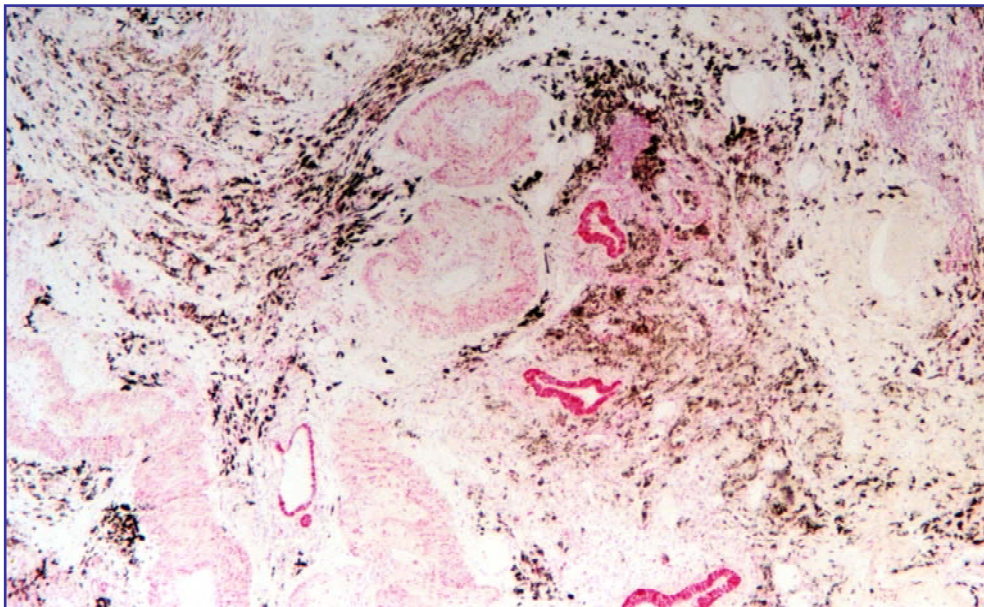


FOTO 8 (Aumentos: 4 x)

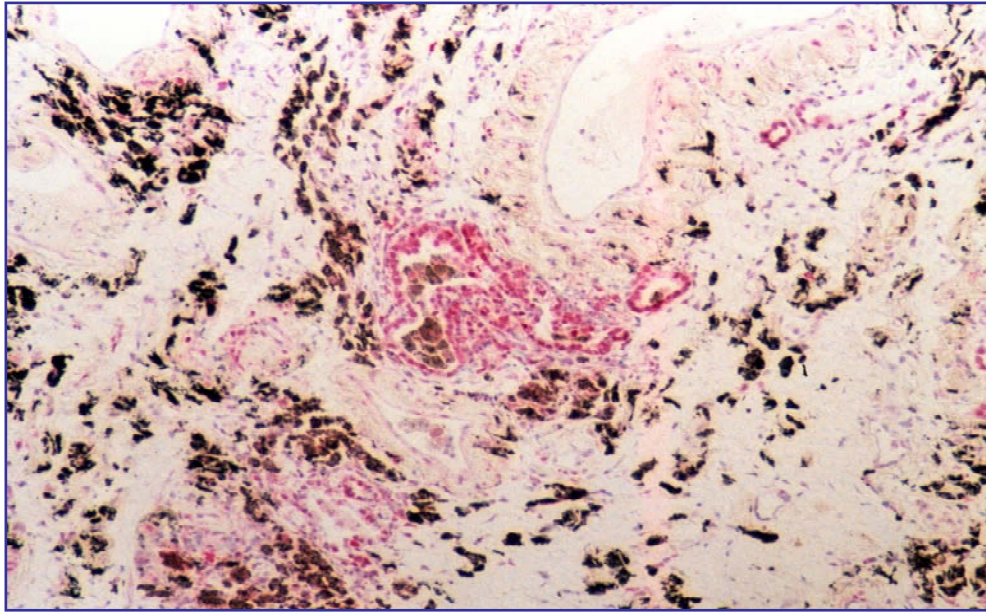


FOTO 9 (Aumentos: 10 x)

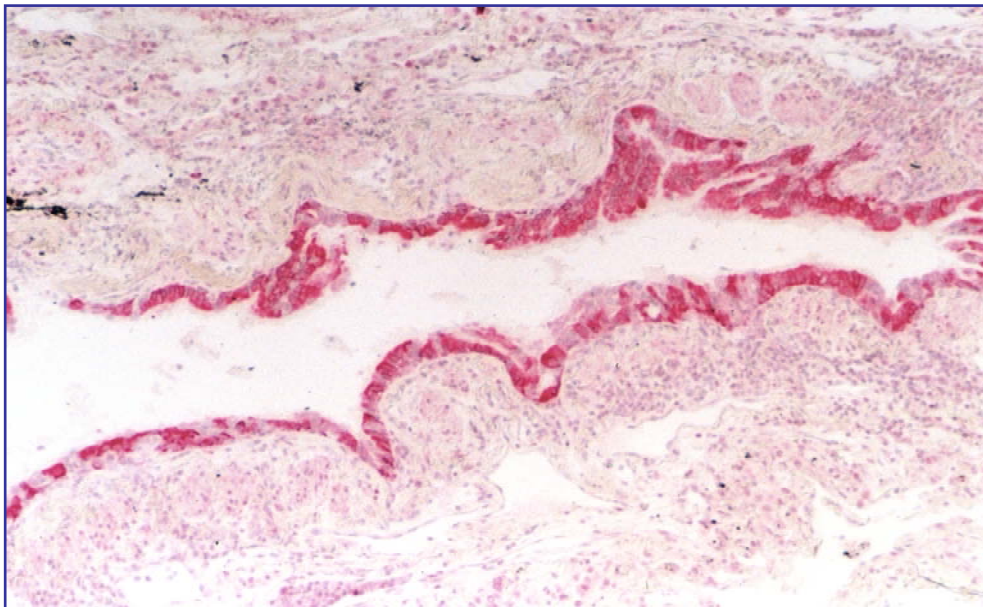


FOTO 10 (Aumentos: 10 x)

HSP 27 se analizó en 64 casos que mostraban alguna estructura pulmonar periférica. (TABLA IV).

TABLA IV

ESTRUCTURAS BRONQUIOLO-ALVEOLARES

	CÉLULAS EPITELIO BRONQUIOLAR	CÉLULAS CALICI- FORMES	CÉLULAS RESERVA	N.TIPO I	N.TIPO II	MACRÓFAGOS ALVEOLARES	CAPILARES SEPTALES
CASOS +/- N° TOTAL	22/41	0/41	0/2	0/60	28/60	1/60	1/60
% CÉLULAS MARCADAS	R: 5-70% ξ: 24.09% σ: 20.73%	0%	0%	0%	R: 5-70% ξ: 16.96% σ: 17.12%	R: 70% ξ: 70% σ: 0.00%	R: 35% ξ: 35% σ: 0.00%
INTENSIDAD	16 + 1 ++ 0 +++ 4 +/+++ 1 ++/+++ 0 +/+++	-	-	-	19 + 4 ++ 1 +++ 4 +/+++ 0 ++/+++ 0 +/+++	1 + 0 ++ 0 +++ 0 +/+++ 0 ++/+++ 0 +/+++	0 + 1 ++ 0 +++ 0 +/+++ 0 ++/+++ 0 +/+++

N.Tipo I: Neumocitos Tipo I; N.Tipo II: Neumocitos Tipo II; Casos +/-N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado tipo celular con respecto del total de casos en los que se encontró ese mismo tipo celular; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/+++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte).

Para *HSP 27* los resultados volvían a repetirse aunque con porcentajes algo inferiores con respecto a los obtenidos en la demostración de la proteína de alto peso molecular. El epitelio bronquiolar y los neumocitos de tipo II eran los dos tipos de estructuras que podían aparecer teñidas.

El 53.7% (22/41) de las muestras en las que se analizó la presencia de epitelio bronquiolar fueron positivas para el antígeno *HSP 27*. En tanto que 28 de los 60

casos (46.7%) que exhibían neumocitos tipo II quedaron marcados para la misma proteína de estrés. El porcentaje de células que aparecían marcadas era siempre y para ambos tipos celulares inferior a un 70%. La proteína de bajo peso molecular se distribuyó sobre las células epiteliales con una ξ del 24.09% y una σ del 20.73%. Los valores de centralización (ξ) y dispersión (σ) correspondientes a los neumocitos tipo II fueron 16.96% y 17.12% respectivamente.

Para ambos tipos celulares la intensidad de la tinción fue altamente variable. De los 22 casos marcados sobre el epitelio bronquiolar 16 mostraron una intensidad de tinción débil, 4 intensidad débil-moderada, 1 intensidad moderada y 1 moderada-fuerte. Por lo que se refiere a los datos de intensidad correspondientes a los neumocitos tipo II cabe destacar que 19 muestras expresaron la proteína de estrés con una intensidad débil, 4 con intensidad débil-moderada, 4 con intensidad moderada y 1 con intensidad fuerte. El marcaje proteico se distribuyó en el citoplasma.

El resto de estructuras pulmonares periféricas resultaron ser una vez más negativas.

La foto 11 representa un epitelio respiratorio fino moderadamente positivo en el citoplasma para *HSP 27*.

La foto 12 conforma una región alveolar con localización de *HSP 27* sobre el citoplasma de los neumocitos tipo II que integran la zona.

La foto 13 revela expresión de la misma proteína en un área de neumocitos tipo II hiperplásicos.

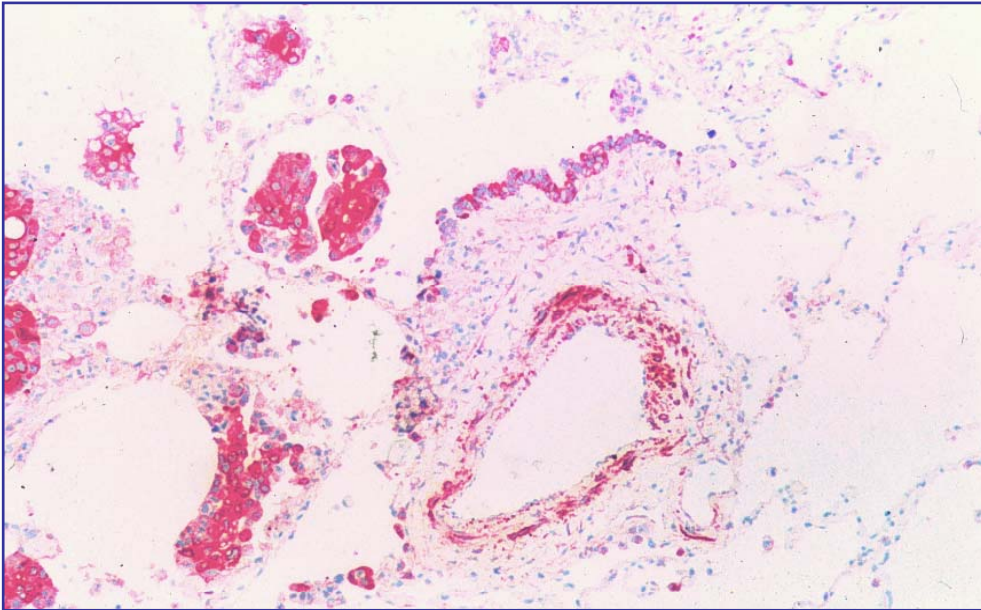


FOTO 11 (Aumentos: 10 x)

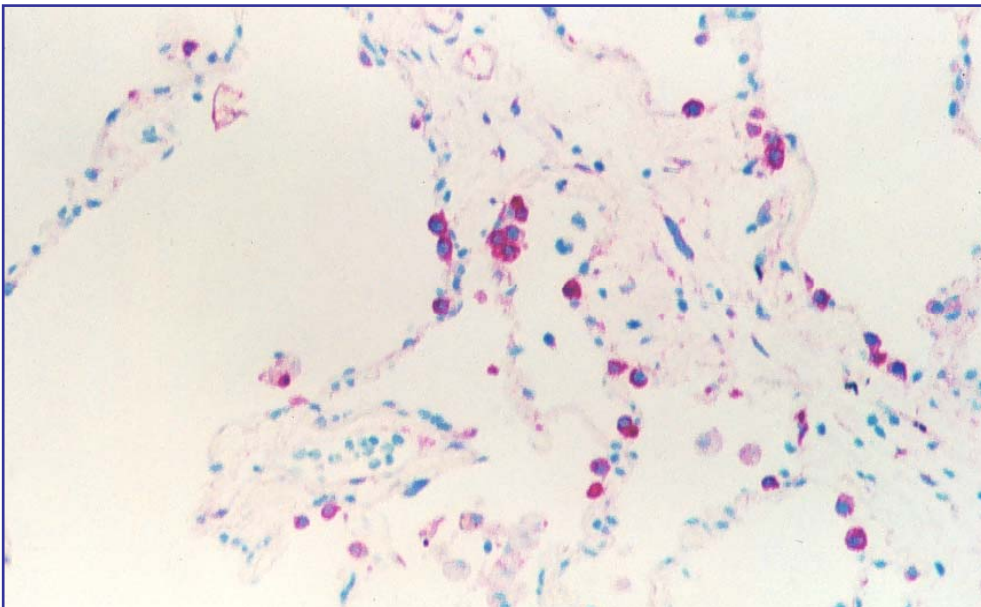


FOTO 12 (Aumentos: 20 x)

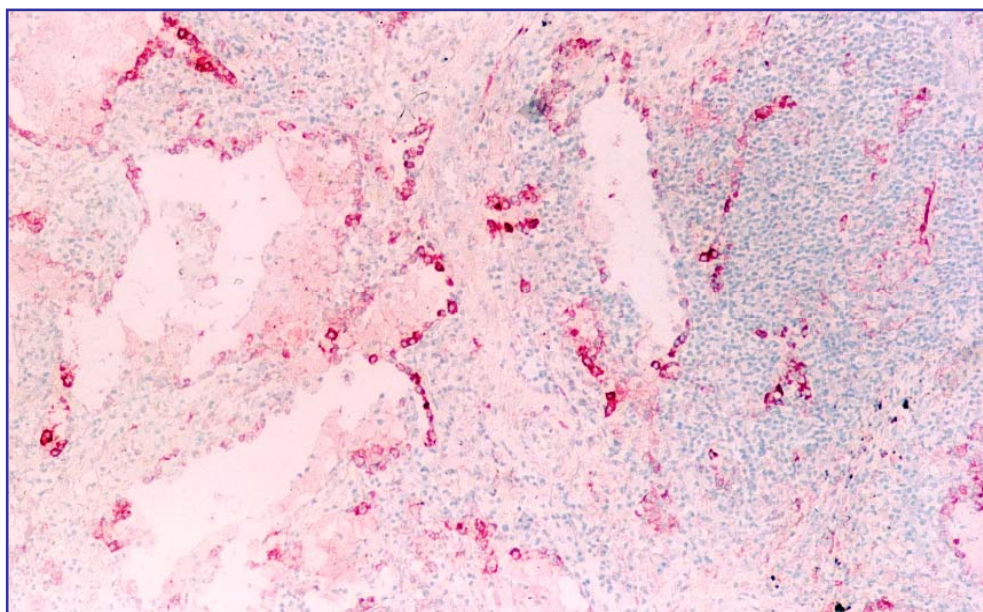


FOTO 13 (Aumentos: 10 x)

3.2.-HSP 70 Y HSP 27 EN EL TEJIDO BRONCOPULMONAR NEOPLÁSICO:

3.2.1.-MARCADORES HISTOANATOMOPATOLÓGICOS:

Los criterios histoanatomopatológicos para la clasificación de los casos se expusieron con detalle en el apartado de material y métodos. Ahora mostramos los resultados derivados de tal recuento.

✠ *Tamaño del Tumor:*

De los 90 casos estudiados 39 (43.3%) presentaron un tumor menor o igual a 3 cm; en 34 (37.8%) el tumor alcanzó una medida mayor de 3 cm pero menor o igual a 6 cm; y en 17 (18.9%) casos el tumor exhibía una medida superior a los 6 cm.

El rango de tamaños correspondiente a nuestra colección tumoral se distribuye entre un valor mínimo de 1 cm y un máximo de 12 cm. El diámetro medio (ξ) es de 4.18 cm ($\sigma=2.28$ cm).

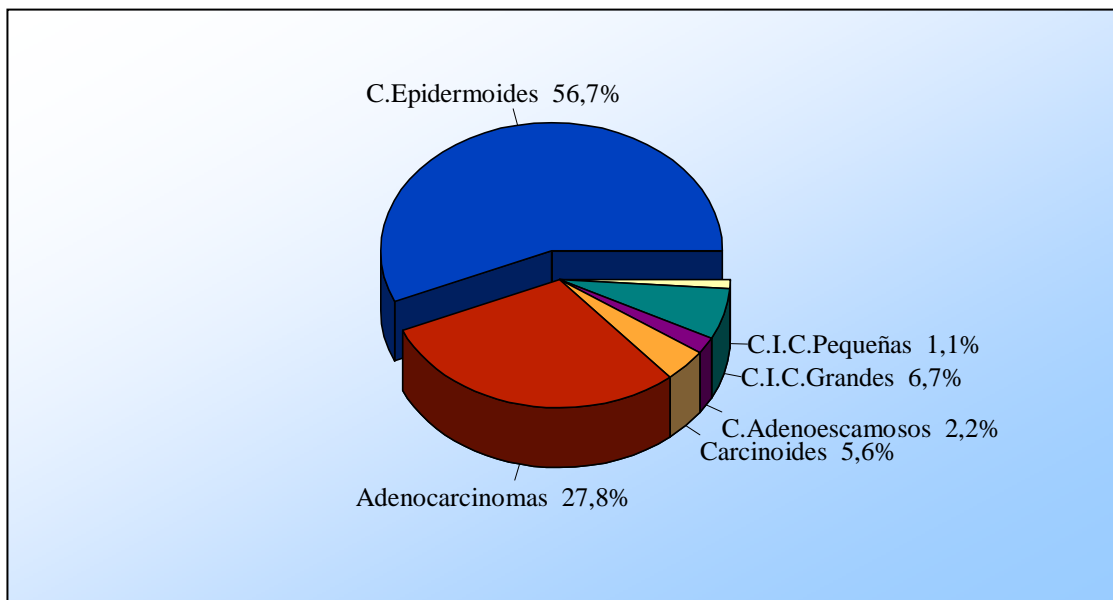
✦ Metástasis a Ganglios Linfáticos Regionales:

57 de los 90 (63.3%) casos analizados en este trabajo no presentaron ningún ganglio linfático regional afectado. 33 (36.7%) pacientes mostraron al menos un ganglio metastásico.

✦ Tipo Histológico:

La presencia de *HSP 70* y *HSP 27* se analizó separadamente en un total de 90 casos con tejidos neoplásicos de los cuales 51 (56.7%) resultaron ser diagnosticados como Carcinomas epidermoides, 25 (27.8%) Adenocarcinomas, 6 (6.7%) Carcinomas indiferenciados de células grandes, 1 (1.1%) Carcinoma indiferenciado de células pequeñas, 2 (2.2%) Carcinomas adenoescamosos y 5 (5.6%) Carcinoides. En la figura 1 se muestra el número de tumores de cada tipo expresado de forma porcentual.

FIGURA 1:



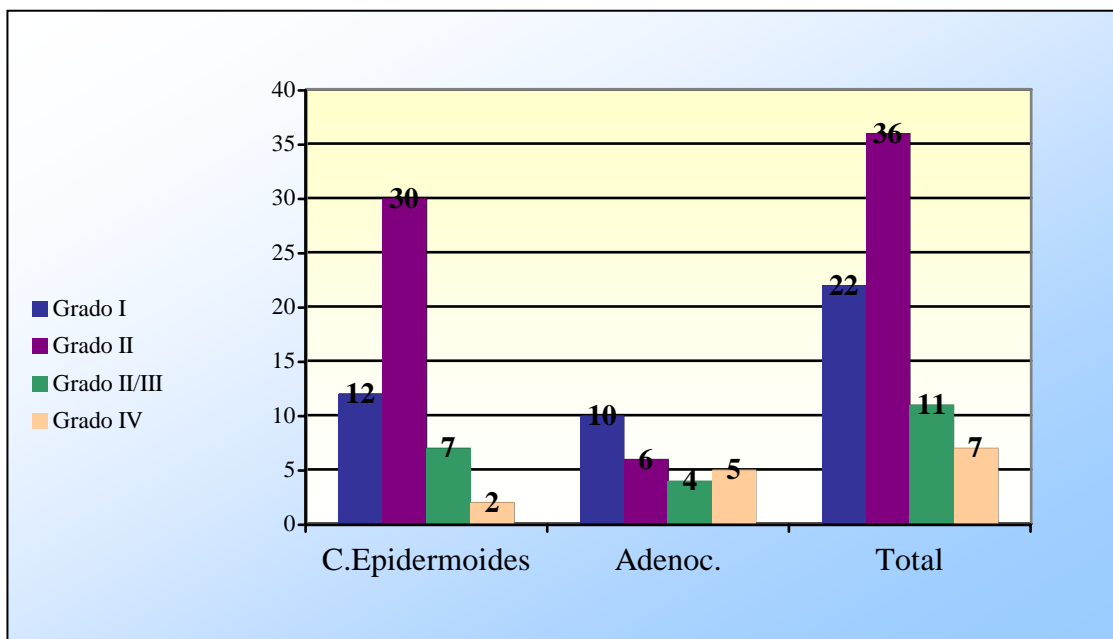
Porcentaje de casos correspondiente a cada tipo histológico tumoral. C: Carcinomas; C.I.C.Grandes: Carcinomas Indiferenciados de Células Grandes; C.I.C.Pequeñas: Carcinomas Indiferenciados de Células Pequeñas. Datos expresados de forma porcentual.

✦ Grado Histológico:

De los 51 carcinomas epidermoides que forman parte de nuestra serie tumoral 12 fueron de grado I; 30 de grado II; 7 de grado II/III y 2 de grado III. Por otra parte, los 25 casos diagnosticados como adenocarcinomas quedaron subclasificados en 10 de grado I; 6 de grado II; 4 de grado II/III y 5 de grado III. Aunando carcinomas epidermoides y adenocarcinomas en un solo grupo contamos con un total de 22 (28.9%) tumores de grado I; 36 (47.4%) de grado II; 11 (14.5%) de grado II/III y 7 (9.2%) de grado III.

La figura 2 pretende representar el número de casos pertenecientes al grado tumoral I, II, II/III o III en que se clasificaron los casos diagnosticados como carcinomas epidermoides y adenocarcinomas.

FIGURA 2:



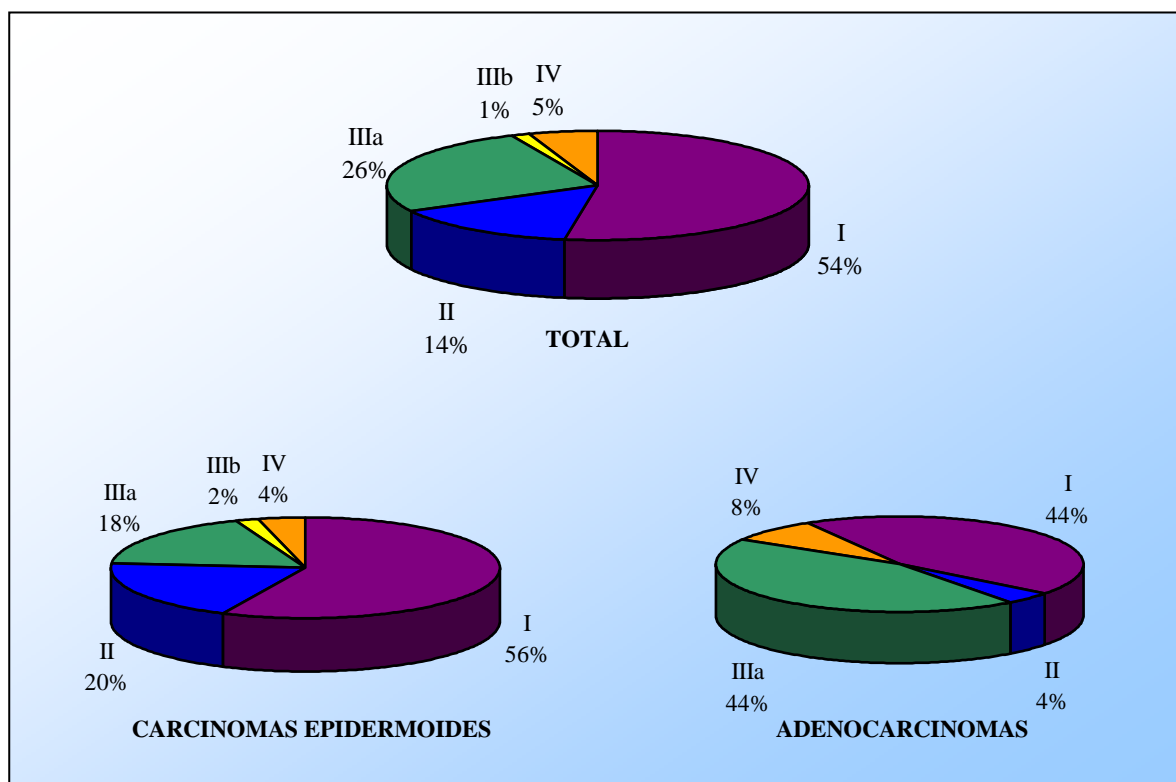
Nº de casos correspondiente a cada grado tumoral en las muestras diagnosticadas como Carcinomas Epidermoides y Adenocarcinomas. C.Epidermoides: Carcinomas Epidermoides; Adenoc.: Adenocarcinomas; Total: Suma de Carcinomas Epidermoides y Adenocarcinomas.

✠ TNM-Estadiaje:

Los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas de los que se compone nuestra serie fueron clasificados según el *Sistema Internacional de TNM para la Estadificación del Cáncer de Pulmón*. De este modo, se pretende estudiar si

existe alguna relación entre el estadiaje correspondiente a los tumores considerados y la detección de la proteína *HSP 70* o *HSP 27* en los mismos. Así, en nuestros resultados nos encontramos con 40 casos de estadiaje I, 11-II, 20-IIIa, 1-IIIb y 4-IV. El número total de casos estadificados se distribuye entre carcinomas epidermoides y adenocarcinomas de la siguiente forma: 29 carcinomas epidermoides de estadiaje I, 10-II, 9-IIIa, 1-IIIb y 2-IV. Asimismo, 11 adenocarcinomas fueron estadificados con un grado I, 1-II, 11-IIIa, 0-IIIb y 2-IV. (FIGURA 3).

FIGURA 3:



Porcentaje de casos correspondiente a cada grado de estadificación tumoral en las muestras diagnosticadas como Carcinomas Epidermoides y Adenocarcinomas. Total: Suma de Carcinomas Epidermoides y Adenocarcinomas. Datos expresados de modo porcentual.

3.2.2.-ESTADO DE SUPERVIVENCIA:

Los tumores pulmonares diagnosticados como carcinomas epidermoides y adenocarcinomas fueron clasificados en base a su correspondiente estado de supervivencia. Un total de 36 casos permanecieron vivos tras un amplio tiempo de seguimiento. De entre ellos 29 permanecen hasta la fecha de hoy libres de enfermedad. Sin embargo, 7 han manifestado recaídas. El resto de pacientes (40) murió a consecuencia del tumor.

3.2.3.-HSP 70 EN EL TEJIDO BRONCOPULMONAR NEOPLÁSICO:

En el estudio de *HSP 70* analizamos cuidadosamente la posible relación que pudiera tener su expresión con los diferentes parámetros histoanatomopatológicos y de supervivencia considerados.

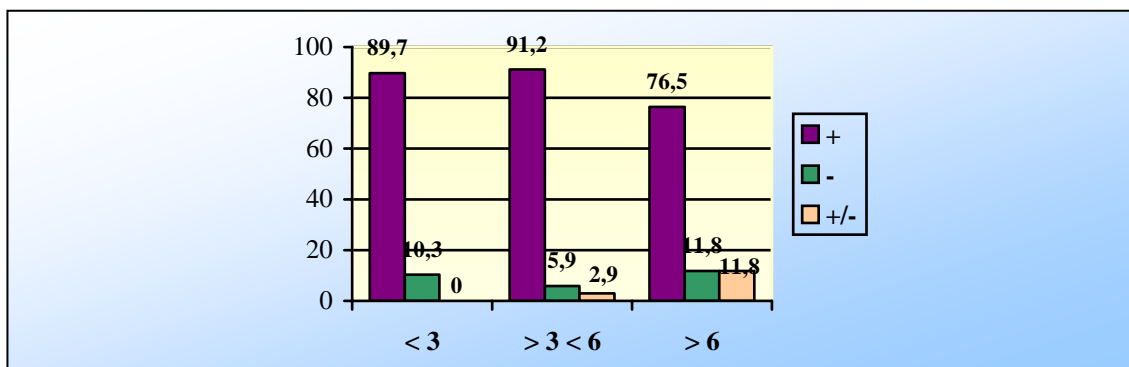
La proteína de choque térmico *HSP 70* ha sido estudiada en los 90 tumores broncopulmonares clasificados en base a su tamaño. Los valores descriptivos denotan que la positividad observada y correspondiente a la proteína de alto peso molecular es menor en las categorías que se refieren a los tumores de mayor diámetro. Sin embargo, las diferencias halladas no resultaron ser estadísticamente significativas ($p>0.05$). La tabla V y figura 4 muestran los datos observados.

TABLA V

	≤ 3 cm	> 3 cm ≤ 6 cm	> 6 cm
+	35	31	13
-	4	2	2
+/-	0	1	2

Positividad para *HSP 70* en función del tamaño tumoral. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 70*; +/-: Tumores + o - para *HSP 70* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++; ≤ 3 cm: Tumores de diámetro menor o igual a 3cm; >3 cm ≤ 6 cm: Tumores de diámetro mayor de 3cm y menor o igual a 6cm; >6 cm: Tumores de diámetro mayor de 6 cm.

FIGURA 4:



Positividad para *HSP 70* en función del tamaño del tumor. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 70*; +/-: Tumores + o - para *HSP 70* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++; ≤ 3 : Tumores de diámetro menor o igual a 3cm; $>3 < 6$: Tumores de diámetro mayor de 3cm y menor o igual a 6cm; ≥ 6 : Tumores de diámetro mayor de 6 cm. Expresión de datos en tanto por ciento.

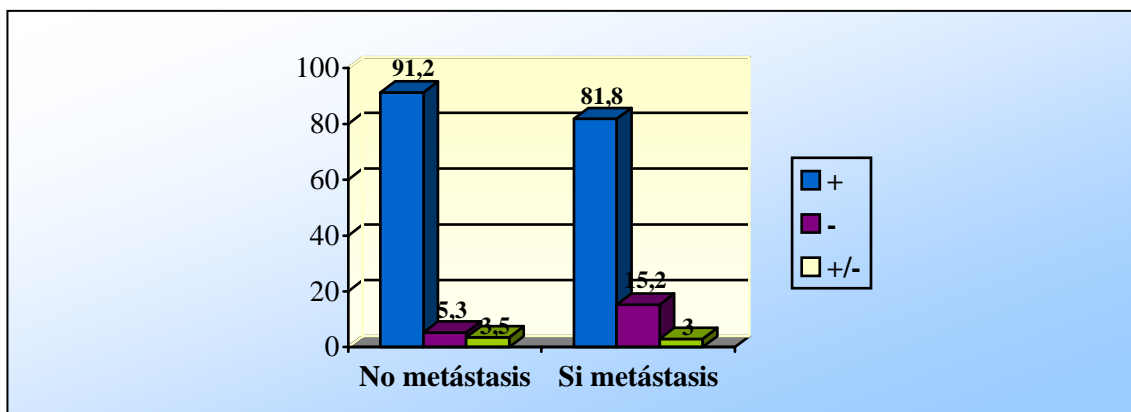
Seguidamente analizamos el marcaje neoplásico obtenido en el estudio de la misma proteína pero esta vez en función de la presencia o ausencia de metástasis a ganglios linfáticos regionales. La tabla VI y figura 5 representan los resultados obtenidos.

TABLA VI

	No metástasis	Sí metástasis
+	52	27
-	3	5
+/-	2	1

Positividad para *HSP 70* en función de la afectación de ganglios linfáticos regionales. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 70*; \pm /: Tumores + o - para *HSP 70* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++.

FIGURA 5:



Positividad para *HSP 70* en función de la afectación de ganglios linfáticos regionales. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 70*; \pm /: Tumores + o - para *HSP 70* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++.

Datos expresados de modo porcentual.

La valoración detenida de los resultados nos lleva a estimar cierta pérdida de expresión proteica en las neoplasias con afectación ganglionar. El estadístico aplicado explica las diferencias por el azar ($p > 0.05$).

A continuación quisimos analizar si existía algún tipo de correlación entre el tipo de tumor diagnosticado en cada paciente junto con el número de casos que

mostraron marcaje respecto del total, el porcentaje de células neoplásicas teñidas en cada muestra, la intensidad de la tinción observada y la localización intracelular del marcaje. Los datos se valoraron primero para la proteína *HSP 70* elaborando de este modo una tabla de contingencia que recogiera toda la información. (TABLA VII).

TABLA VII

TIPOS TUMORALES

	CARCINOMAS EPIDERMÓIDES	ADENO- CARCINOMAS	C. ADENO- ESCAMOSOS	C.I.C. GRANDES	C.I.C. PEQUEÑAS	CARCINOIDES
CASOS+/ Nº TOTAL	51/51	25/25	1/2	6/6	1/1	5/5
% CÉLULAS MARCADAS	R: 10-100% ξ: 86.47% σ: 23.04%	R: 10-100% ξ: 81.20% σ: 29.05%	R: 80% ξ: 80% σ: 0.00%	R: 80-100% ξ: 95.00% σ: 8.36%	R: 100% ξ: 100% σ: 0.00%	R: 70-100% ξ: 94.00% σ: 13.41%
INTENSIDAD	7 + 3 ++ 2 +++ 19 +/+++ 8 ++/++++ 12 +/++++	3 + 6 ++ 2 +++ 10 +/+++ 1 ++/++++ 3 +/++++	0 + 0 ++ 0 +++ 1 +/+++ 0 ++/++++ 0 +/++++	2 + 0 ++ 0 +++ 2 +/+++ 2 ++/++++ 0 +/++++	0 + 0 ++ 0 +++ 1 +/+++ 0 ++/++++ 0 +/++++	2 + 0 ++ 1 +++ 2 +/+++ 0 ++/++++ 0 +/++++
PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN	C 14 N 1 C+N 36	C 4 N 2 C+N 19	C 1 N 0 C+N 0	C 1 N 0 C+N 5	C 0 N 0 C+N 1	C 2 N 0 C+N 3

C.I.C. Grandes: Carcinomas Indiferenciados de células Grandes; C.I.C. Pequeñas: Carcinomas Indiferenciados de Células Pequeñas; C. Adenoescamosos: Carcinomas Adenoescamosos; Casos +/Nº Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado tipo tumoral con respecto del total; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/+++ (débil-moderado), ++/++++ (moderado-fuerte), +/++++ (débil-fuerte); Patrón de Distribución: Localización intracelular del marcaje: C (citoplásmico), N (nuclear), C+N (citoplásmico y nuclear).

La tabla VII nos muestra que el marcaje observado para la proteína *HSP 70* fue ausente en tan solo un caso de los 90 tumores analizados. El único caso negativo resultó ser diagnosticado como un carcinoma adenoescamoso. El valor promedio (ξ) correspondiente a la distribución que representa el marcaje celular resulta elevado en todos los tipos tumorales definidos y no hallamos diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p>0.05$). Los índices de dispersión (σ) nos revelan que se trata de unos datos suficientemente concentrados. La intensidad del marcaje es variable en todos los tipos neoplásicos y la localización resultó ser citoplásmica y/o nuclear de forma aparentemente arbitraria como ha venido siendo habitual en el estudio de la proteína *HSP 70*.

Sin embargo, creyendo que esta forma de analizar los resultados referentes a los tejidos tumorales resultaba ser incompleta elaboramos una segunda tabla que nos aportara una información más amplia. Para ello seguimos las pautas previamente descritas en el apartado de material y métodos. (*TABLA VIII*).

TABLA VIII

TIPOS TUMORALES

	CARCINOMAS EPIDERMOIDES	ADENO- CARCINOMAS	C. ADENO- ESCAMOSOS	C.I.C. GRANDES	C.I.C. PEQUEÑAS	CARCINOIDES
Nº TOTAL CASOS	51	25	2	6	1	5
+	45 (88.2%)	21 (84.0%)	1 (50.0%)	6 (100%)	1 (100%)	5 (100%)
-	4	3	1	0	0	0
+/-	2	1	0	0	0	0

C.I.C. Grandes: Carcinomas Indiferenciados de células Grandes; C.I.C. Pequeñas: Carcinomas Indiferenciados de Células Pequeñas; C. Adenoescamosos: Carcinomas Adenoescamosos; Nº Total Casos: Nº de casos analizados y pertenecientes a cada tipo tumoral; (+): Nº de casos altamente positivos en el tejido tumoral.; (-): Nº de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral.; (+/-): Nº de casos cuya positividad (alta, baja o negativos) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 70* expresado de forma porcentual.

Esta última forma de analizar los resultados nos aporta nuevos datos. Se pudo observar una elevada positividad en 79 de los 90 tumores (87.8%) que componen nuestra serie, mientras que solamente 8 tumores (8.9%) mostraron una positividad baja o resultaron ser negativos (7 tumores presentaron una positividad baja y 1 resultó ser negativo). Los 3 (3.3%) casos que restan para componer la totalidad de las neoplasias presentaron una positividad tipo +/- debido a su alta variabilidad en la intensidad del marcaje. (TABLA VIII).

Un alto grado de positividad para la proteína *HSP 70* fue observado en el 88.2% de los casos diagnosticados como carcinomas epidermoides (45 casos altamente positivos de 51), el 84% de los adenocarcinomas (21 casos altamente positivos de 25), el 100% de los carcinoideas, carcinomas indiferenciados de células grandes y

carcinomas indiferenciados de células pequeñas y el 50% de los carcinomas adenoescamosos. Es de interés advertir que la proteína *HSP 70* parece expresarse con una positividad elevada en la totalidad de los carcinomas más agresivos (carcinomas indiferenciados de células grandes y carcinomas indiferenciados de células pequeñas). (TABLA VIII).

El test de asociación Chi-cuadrado aplicado nos revela que la diferencia de positividad observada entre los tipos tumorales considerados no es estadísticamente significativa ($p>0.05$).

La foto 14 constituye un carcinoma epidermoide en donde *HSP 70* se distribuye con intensidad variable. Un epitelio marcado acompaña al tumor.

La foto 15 muestra un carcinoma indiferenciado de células grandes moderadamente marcado para la proteína de alto peso molecular. La imagen se ve salpicada por algunas células fuertemente reactivas.

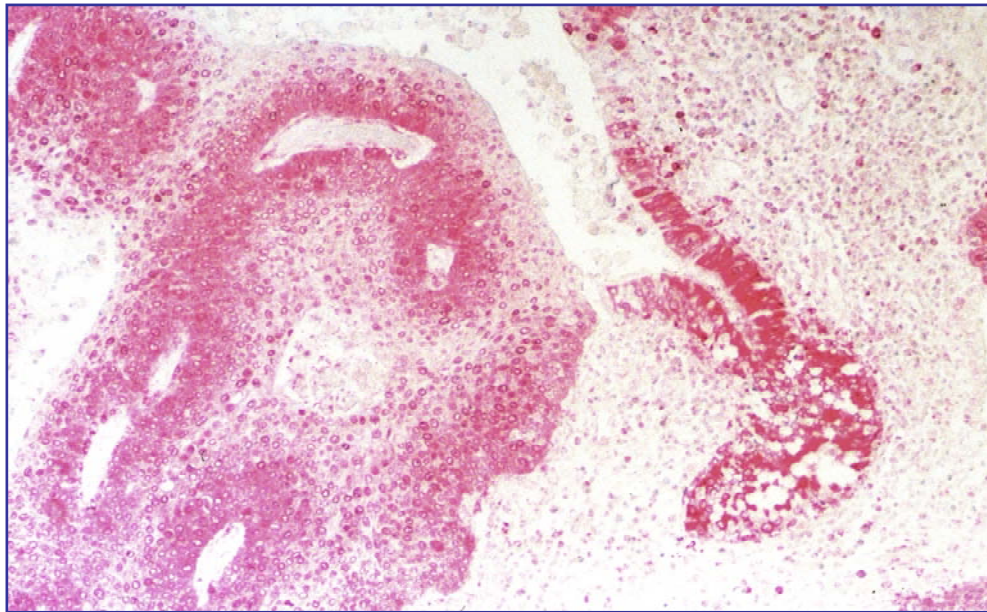


FOTO 14 (Aumentos: 10 x)

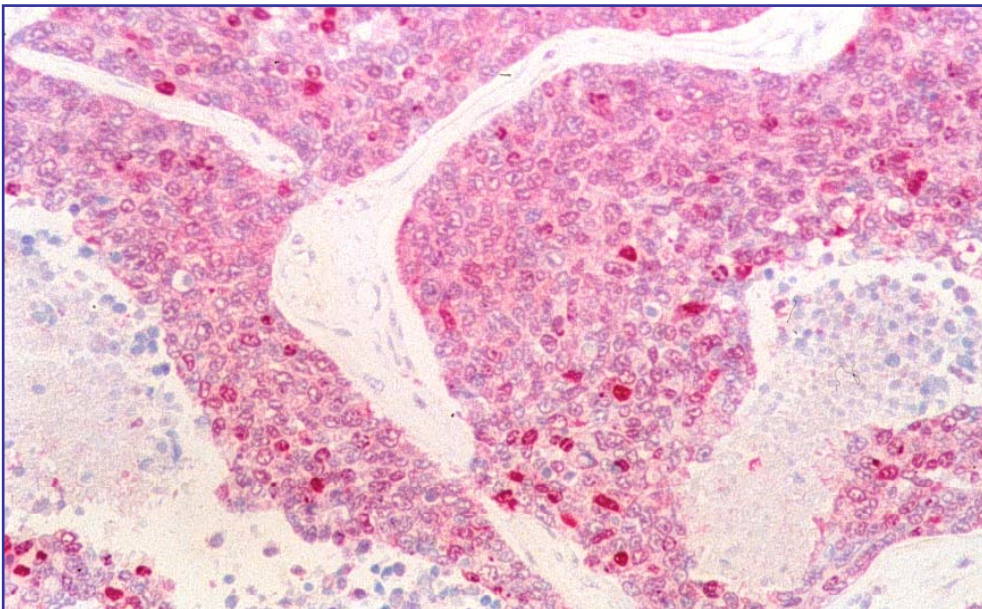


FOTO 15 (Aumentos: 20 x)

Siguiendo las mismas pautas de estudio aplicadas hasta ahora reflejamos en las tablas IX y X los datos descriptivos referentes a la expresión de la proteína *HSP 70* en función del grado tumoral adjudicado a las muestras analizadas.

TABLA IX

GRADOS TUMORALES

GRADO TUMORAL	CARCINOMAS EPIDERMOIDES				ADENOCARCINOMAS			
	I	II	II/III	III	I	II	II/III	III
CASOS+/ N° TOTAL	12/12	30/30	7/7	2/2	10/10	6/6	4/4	5/5
% CÉLULAS MARCADAS	R: 20-100% ξ: 86.66% σ: 26.40%	R: 10-100% ξ: 87.66% σ: 20.45%	R: 50-100% ξ: 88.57% σ: 18.64%	R: 20-100% ξ: 60.00% σ: 56.56%	R: 10-100% ξ: 77.00% σ: 34.00%	R: 50-100% ξ: 88.33% σ: 20.41%	R: 80-100% ξ: 90.00% σ: 11.54%	R: 10-100% ξ: 74.00% σ: 39.74%
INTENSIDAD	1 + 1 ++ 0 +++ 7 +/++ 1 ++/+++ 2 +/+++	4 + 1 ++ 1 +++ 11 +/++ 5 ++/+++ 8 +/+++	1 + 1 ++ 0 +++ 1 +/++ 2 ++/+++ 2 +/+++	1 + 0 ++ 1 +++ 0 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	2 + 1 ++ 1 +++ 4 +/++ 1 ++/+++ 1 +/+++	1 + 4 ++ 0 +++ 1 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	0 + 1 ++ 1 +++ 2 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	0 + 0 ++ 0 +++ 3 +/++ 0 ++/+++ 2 +/+++
PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN	C 5 N 0 C+N 7	C 8 N 0 C+N 22	C 1 N 1 C+N 5	C 0 N 0 C+N 2	C 4 N 1 C+N 5	C 0 N 0 C+N 6	C 0 N 1 C+N 3	C 0 N 0 C+N 5

Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado grado tumoral con respecto del total;

% Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica);

Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte);

Patrón de Distribución: Localización intracelular del marcaje: C (citoplásmico), N (nuclear), C+N (citoplásmico y nuclear).

TABLA X

GRADOS TUMORALES

GRADO TUMORAL	CARCINOMAS EPIDERMOIDES				ADENOCARCINOMAS			
	I	II	II/III	III	I	II	II/III	III
N° TOTAL CASOS	12	30	7	2	10	6	4	5
+	10 (83.3%)	28 (93.3%)	6 (85.7%)	1 (50%)	7 (70%)	6 (100%)	4 (100%)	4 (80%)
-	1	2	0	1	2	0	0	1
+/-	1	0	1	0	1	0	0	0

N° Total Casos: N° de casos analizados y pertenecientes a cada grado tumoral; (+): N° de casos altamente positivos en el tejido tumoral.; (-): N° de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral.; (+/-): N° de casos cuya positividad (alta, baja o negativa) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 70* expresado de forma porcentual.

Ante todo, cabe decir que en estas dos tablas quedan representados exclusivamente aquellos casos diagnosticados como carcinomas epidermoides y adenocarcinomas. Y es que, son los únicos tipos tumorales que admiten una subclasificación según el grado tumoral.

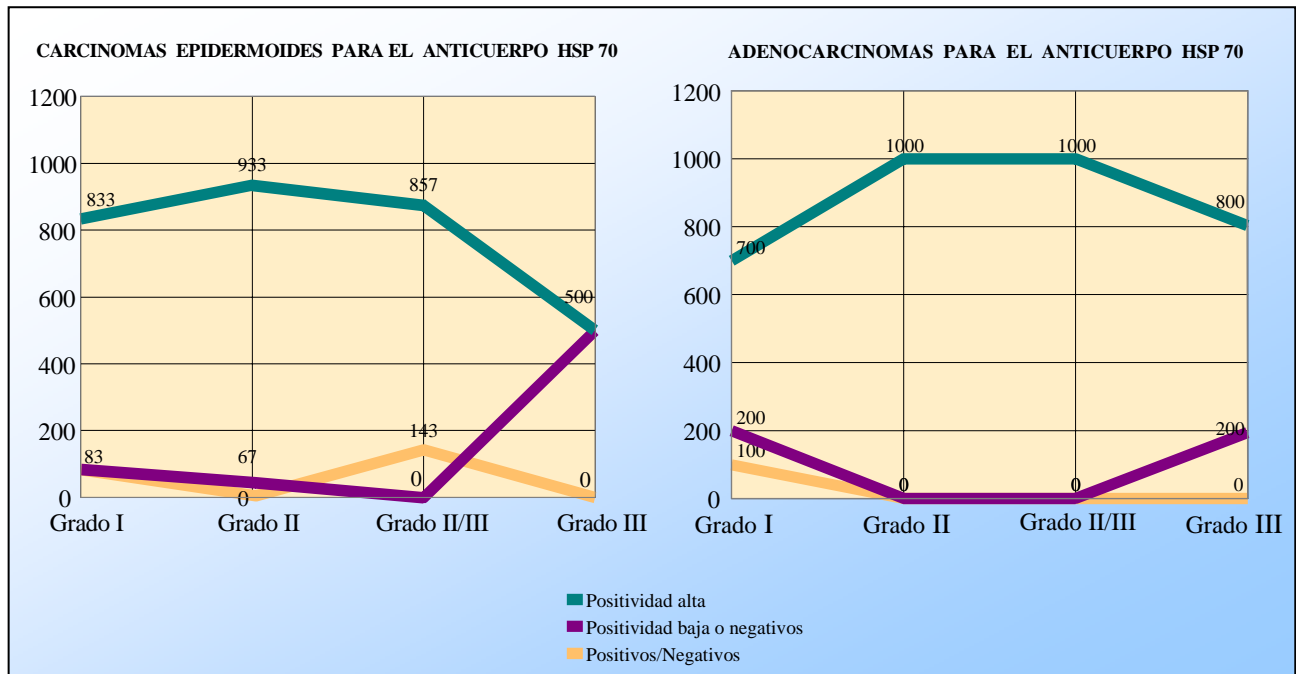
La tabla X nos ofrece los resultados más interesantes. El porcentaje de carcinomas epidermoides con una elevada positividad en la tinción aparentaba ser menor en los tumores de bajo grado. Así, la expresión proteica aumenta con el grado neoplásico. Sin embargo, los tumores de grado mas alto (III) vuelven a mostrar un valor decadente. El pico máximo de positividad corresponde a los carcinomas epidermoides de grado II (28 casos altamente positivos de 30 (93.3%)).

Seguidamente consideramos la positividad proteica hallada con respecto al grado neoplásico de los 25 adenocarcinomas diagnosticados. Así, el 70% de los adenocarcinomas de grado I (7/10), el 100% de los adenocarcinomas de grado II-II/III y el 80% de los casos de grado III (4/5) resultaron ser altamente positivos ante la demostración del antígeno *HSP 70*. Por lo tanto, un comportamiento parecido al de los carcinomas epidermoides se encontró en los adenocarcinomas analizados. En este último caso se alcanza un pico máximo de expresión en los adenocarcinomas de grado II y II/III. (TABLA X).

No obstante la asociación analizada descriptivamente para los carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas considerados no resultó ser estadísticamente significativa ($p>0.05$).

La figura 6 representa gráficamente los datos recogidos en la tabla X.

FIGURA 6:



Positividad para *HSP 70* en función del grado tumoral. Positividad alta: Casos altamente positivos en el tejido tumoral para la demostración del antígeno *HSP 70*; Positividad baja o negativos: Casos con positividad baja o negativos en el tejido tumoral para la demostración del antígeno *HSP 70*; Positivos/Negativos: Casos cuya positividad varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de débil a fuerte. Todos los valores de la figura están representados en tantos por mil.

La foto 16 refleja un carcinoma epidermoide de alto grado histológico marcado intensamente para la proteína de choque térmico de elevado peso molecular. En la parte superior de la imagen un epitelio bronquial aparece teñido para el mismo antígeno.

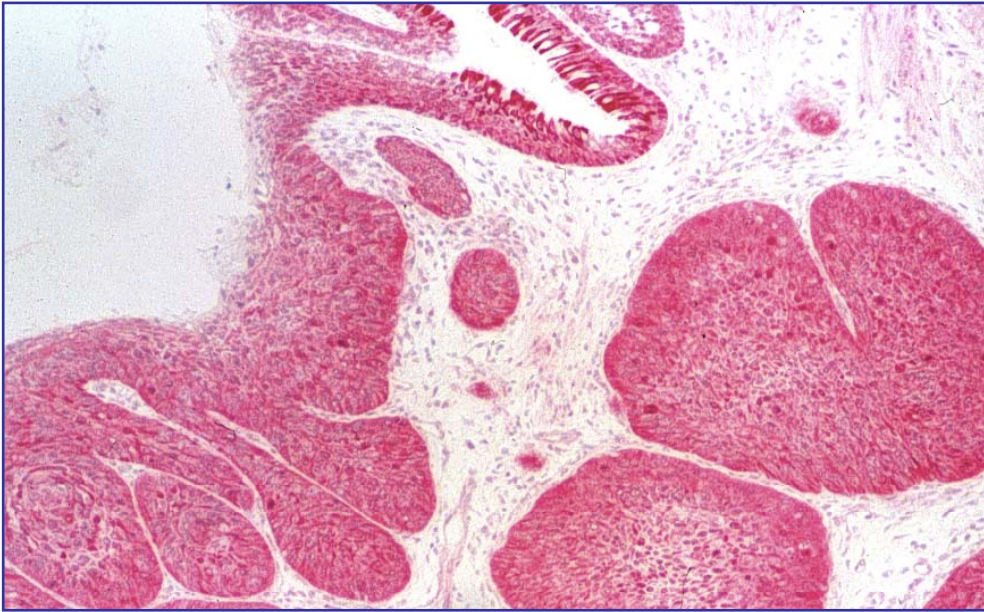


FOTO 16 (Aumentos: 10 x)

Nuestra siguiente inquietud es saber si el estadiaje adjudicado a cada caso influye sobre la positividad hallada en las muestras y correspondiente a la proteína *HSP 70*. Para tal fin elaboramos dos nuevos cuadros que incluyen los datos más relevantes. (TABLAS XI Y XII). Junto a ellos un sencillo gráfico nos ayudará a comprender mejor los resultados. (FIGURA 7).

TABLA XI

ESTADIAJES

ESTADIAJE	CARCINOMAS EPIDERMOIDES					ADENOCARCINOMAS				
	I	II	IIIa	IIIb	IV	I	II	IIIa	IIIb	IV
CASOS + / N° TOTAL	29/29	10/10	9/9	1/1	2/2	11/11	1/1	11/11	0/0	2/2
% CÉLULAS MARCADAS	R: 10-100% ξ: 84.82% σ: 24.73%	R: 50-100% ξ: 91.00% σ: 17.28%	R: 20-100% ξ: 85.55% σ: 26.97 %	R: 100% ξ: 100.00% σ: 0.00%	R: 70-100% ξ: 85.00% σ: 21.21%	R: 80-100% ξ: 93.63% σ: 9.24%	R: 100% ξ: 100.00% σ: 0.00%	R: 10-100% ξ: 63.63% σ: 36.40%	*	R: 100% ξ: 100.00% σ: 0.00%
INTENSIDAD	5 + 0 ++ 2 +++ 10 +/+++ 5 ++/+++ 7 +/+++	2 + 2 ++ 0 +++ 3 +/+++ 0 ++/+++ 3 +/+++	0 + 1 ++ 0 +++ 4 +/+++ 2 ++/+++ 2 +/+++	0 + 0 ++ 0 +++ 1 +/+++ 0 ++/+++ 0 +/+++	0 + 0 ++ 0 +++ 1 +/+++ 1 ++/+++ 0 +/+++	1 + 2 ++ 1 +++ 6 +/+++ 1 ++/+++ 0 +/+++	1 + 0 ++ 0 +++ 0 +/+++ 0 ++/+++ 0 +/+++	1 + 3 ++ 1 +++ 4 +/+++ 0 ++/+++ 2 +/+++	*	0 + 1 ++ 0 +++ 0 +/+++ 0 ++/+++ 1 +/+++
PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN	C 6 N 1 C+N 22	C 4 N 0 C+N 6	C 1 N 0 C+N 8	C 1 N 0 C+N 0	C 2 N 0 C+N 0	C 0 N 1 C+N 10	C 0 N 0 C+N 1	C 4 N 1 C+N 6	*	C 0 N 0 C+N 2

Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado estadiaje tumoral con respecto del total; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/+++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte); Patrón de Distribución: Localización intracelular del marcaje: C (citoplásmico), N (nuclear), C+N (citoplásmico y nuclear).

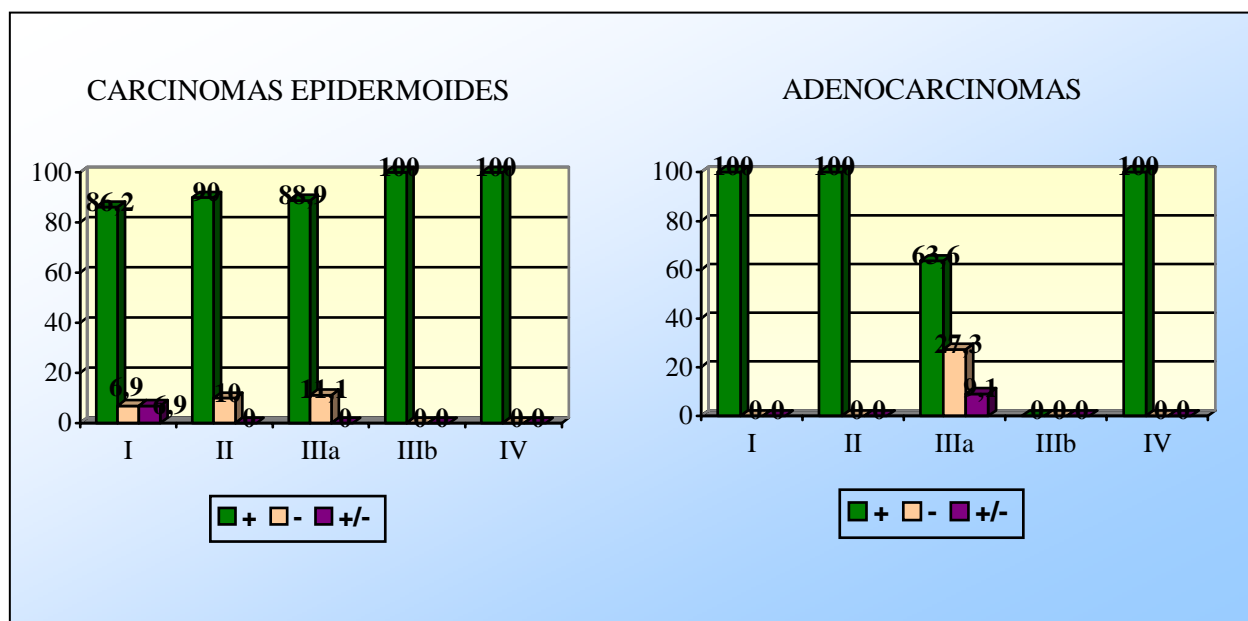
TABLA XII

ESTADIAJES

ESTADIAJE	CARCINOMAS EPIDERMOIDES					ADENOCARCINOMAS				
	I	II	IIIa	IIIb	IV	I	II	IIIa	IIIb	IV
N° TOTAL CASOS	29	10	9	1	2	11	1	11	0	2
+	25 (86.2%)	9 (90%)	8 (88.9%)	1 (100%)	2 (100%)	11 (100%)	1 (100%)	7 (63.6%)	0	2 (100%)
-	2	1	1	0	0	0	0	3	0	0
+/-	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0

N° Total Casos: N° de casos analizados y pertenecientes a cada estadiaje; (+): N° de casos altamente positivos en el tejido tumoral; (-): N° de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral; (+/-): N° de casos cuya positividad (alta, baja o negativa) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a ++++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 70* expresado de forma porcentual.

FIGURA 7:



Positividad para *HSP 70* en función del estadiaje. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 70*; +/-: Tumores + o - para *HSP 70* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. Datos expresados de modo porcentual.

De entre aquellos carcinomas epidermoides considerados con un estadiaje I hemos hallado que el 6.9% (2/29) fueron negativos o débilmente positivos para el marcaje de *HSP 70*. Haciendo la misma operación encontramos que el 10% (1/10) de los casos diagnosticados con estadiaje II y el 11.1% (1/9) de los casos con estadiaje IIIa fueron negativos o de baja positividad para la misma proteína de estrés. Tales valoraciones nos llevan a sospechar de una pérdida de expresión para la proteína *HSP 70* entre los tumores epidermoides con elevado grado de estadificación. (TABLA XII) (FIGURA 7). Sin embargo, el test de asociación Chi-cuadrado aplicado no confirma desde el punto de vista estadístico la heterogeneidad de las muestras ($p > 0.05$).

La misma entidad proteica ha sido analizada en función del estadiaje entre los adenocarcinomas integrantes de nuestra serie tumoral. El 100% (11/11, 1/1 y 2/2) de los casos estadiados con los grados I, II y IV respectivamente muestran una elevada positividad para el antígeno de alto peso molecular. Tan solo los adenocarcinomas IIIa exhiben en menor medida la proteína de estrés. El 63.6% (7/11) de los adenocarcinomas considerados con un estadiaje IIIa fueron altamente positivos para el marcaje de *HSP 70*. (TABLA XII) (FIGURA 7).

Obviando aquellos estadios menos representativos debido a la escasez de casos integrantes podríamos intuir que los adenocarcinomas de más baja estadiación (I) expresan mayormente la proteína *HSP 70* que los tumores de estadiaje superior (IIIa). Sin embargo, nuestro estadístico no ha sido capaz de apoyar los valores observados ($p > 0.05$).

El estado de supervivencia constituye el último parámetro considerado en relación con el inmunomarcaje correspondiente a la proteína *HSP 70*. La asociación se estableció para un total de 76 tumores pulmonares diagnosticados como carcinomas epidermoides y adenocarcinomas. El resto de tumores queda excluido al constituir grupos excesivamente pequeños y no representativos para su examen.

Las mismas pautas de estudio aplicadas hasta ahora nos sirven para el nuevo análisis. De este modo, la tabla XIII nos ofrece algunos datos sobre el marcaje proteico observado en dependencia del estado de supervivencia de los pacientes. Todas las muestras ofrecieron en mayor o menor medida tinción para la proteína de alto peso molecular. Tal hecho impidió calcular ninguna medida de asociación al ser el marcaje correspondiente a *HSP 70* una constante. Por otra parte, los

carcinomas epidermoides muestran medias de marcaje (ξ) elevadas en todos los estados de supervivencia definidos y los valores de dispersión (σ) son característicos de distribuciones suficientemente concentradas. Un grado de significación mayor de 0.05 nos lleva a aceptar la hipótesis nula bajo la cual el estado de supervivencia no influye en los valores medios (ξ) correspondientes al porcentaje de células marcadas. Los casos diagnosticados como adenocarcinomas ofrecen un comportamiento similar a excepción de los individuos que murieron a consecuencia del tumor cuyo porcentaje medio de células teñidas disminuyó hasta un 68.33% ($\sigma=36.39\%$). En este caso la diferencia descriptiva no es apoyada estadísticamente ($p>0.05$). Por otra parte la intensidad y el patrón de tinción se distribuyen en carcinomas epidermoides y adenocarcinomas de forma independiente del estado de supervivencia ($p>0.05$).

TABLA XIII

ESTADOS DE SUPERVIVENCIA

ESTADO DE SUPERVIVENCIA	CARCINOMAS EPIDERMOIDES			ADENOCARCINOMAS		
	VIVOS		MUERTOS	VIVOS		MUERTOS
	LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES		LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES	
CASOS + / N° TOTAL	18/18	5/5	28/28	11/11	2/2	12/12
% CÉLULAS MARCADAS	R: 20-100% ξ: 83.33% σ: 22.22%	R: 50-100% ξ: 90.00% σ: 22.36%	R: 10-100% ξ: 87.85% σ: 24.24%	R: 60-100% ξ: 93.63% σ: 12.86%	R: 80-100% ξ: 90.00% σ: 14.14%	R: 10-100% ξ: 68.33% σ: 36.39%
INTENSIDAD	3 + 2 ++ 0 +++ 5 +/++ 4 ++/+++ 4 +/+++	1 + 0 ++ 0 +++ 1 +/++ 0 ++/+++ 3 +/+++	3 + 1 ++ 2 +++ 13 +/++ 4 ++/+++ 5 +/+++	0 + 3 ++ 2 +++ 3 +/++ 1 ++/+++ 2 +/+++	1 + 0 ++ 0 +++ 1 +/++ 0 ++/+++ 0 +/+++	2 + 3 ++ 0 +++ 6 +/++ 0 ++/+++ 1 +/+++
PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN	C 5 N 0 C+N 13	C 0 N 0 C+N 5	C 9 N 1 C+N 18	C 0 N 2 C+N 9	C 1 N 0 C+N 1	C 3 N 0 C+N 9

Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado estado de supervivencia con respecto del total; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte); Patrón de Distribución: Localización intracelular del marcaje: C (citoplásmico), N (nuclear), C+N (citoplásmico y nuclear).

La tabla XIV corrobora resultados previos a la vez que ofrece nuevos valores correspondientes a la expresión de *HSP 70* en función del estado de supervivencia.

TABLA XIV

ESTADOS DE SUPERVIVENCIA

ESTADO DE SUPERVIVENCIA	CARCINOMAS EPIDERMOIDES			ADENOCARCINOMAS		
	VIVOS		MUERTOS	VIVOS		MUERTOS
	LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES		LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES	
Nº TOTAL CASOS	18	5	28	11	2	12
+	16 (88.9%)	4 (80%)	25 (89.3%)	11 (100%)	2 (100%)	8 (66.7%)
-	1	0	3	0	0	3
+/-	1	1	0	0	0	1

Nº Total Casos: Nº de casos analizados y correspondientes a cada estado de supervivencia; (+): Nº de casos altamente positivos en el tejido tumoral; (-): Nº de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral.; (+/-): Nº de casos cuya positividad (alta, baja o negativa) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a ++++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 70* expresado de forma porcentual.

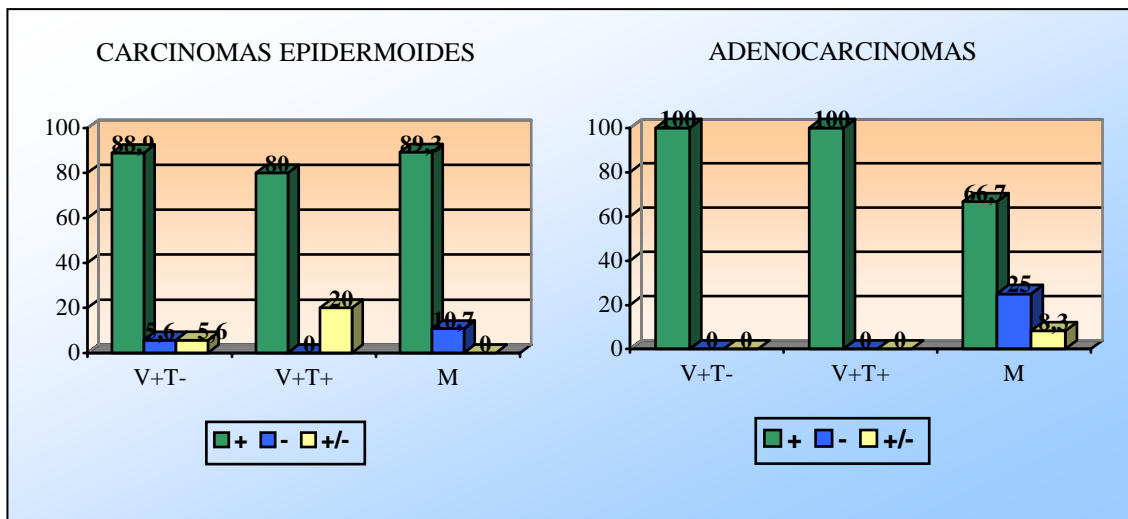
Fijando nuestra atención en los tumores diagnosticados como carcinomas epidermoides podemos interpretar la existencia de una positividad para la proteína de alto peso molecular equiparable en los diferentes estados de supervivencia considerados. Y es que la presencia de *HSP 70* es demostrada con valores de positividad elevada en el 88.9% (16/18) de los carcinomas epidermoides correspondientes a pacientes que superaron la enfermedad. Del mismo modo, la proteína ha sido localizada con una alta positividad en el 80% (4/5) de los individuos recidivantes y en el 89.3% (25/28) de los que murieron. No obstante, hallamos que el 5.6% (1/18) de los carcinomas epidermoides diagnosticados sobre pacientes que evolucionaron a un estado libre de enfermedad fueron negativos o débilmente positivos para la proteína de alto peso

molecular. Si además consideramos que el 10.7% (3/28) de los pacientes que murieron a consecuencia del tumor fueron negativos o de baja positividad podríamos estimar que los individuos con menor supervivencia sufren pérdidas de expresión para la proteína *HSP 70*. Sin embargo, el estadístico aplicado no ha sido capaz de demostrar la hipótesis alternativa ($p>0.05$).

Los resultados se muestran similares para los tumores clasificados como adenocarcinomas. El 100% de los pacientes “vivos” (11/11 libres de enfermedad y 2/2 recidivantes) manifestó una elevada inmunolocalización tumoral para la proteína de alto peso molecular, en tanto que la misma positividad fue contabilizada en 8 de los 12 sujetos (66.7%) que murieron a consecuencia del tumor. Tales valores nos llevan a intuir una localización proteica notablemente mayor en los adenocarcinomas identificados con los estados de supervivencia más favorecidos. De nuevo, los resultados no fueron estadísticamente significativos ($p>0.05$).

La figura 8 muestra gráficamente la distribución neoplásica de *HSP 70* en función de los estados de supervivencia considerados.

FIGURA 8:



Positividad para *HSP 70* en función del estado de supervivencia. V+T-: Pacientes vivos y libres de enfermedad; V+T+: Pacientes vivos con tumor recidivante; M: Muertos; \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 70*; \pm : Tumores + o - para *HSP 70* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++ . Datos expresados de modo porcentual.

3.2.4.-HSP 27 EN EL TEJIDO PULMONAR NEOPLÁSICO:

En este subapartado analizamos la expresión de la proteína de estrés de bajo peso molecular (*HSP 27*) en función de los diferentes parámetros histoanatomopatológicos y de supervivencia considerados.

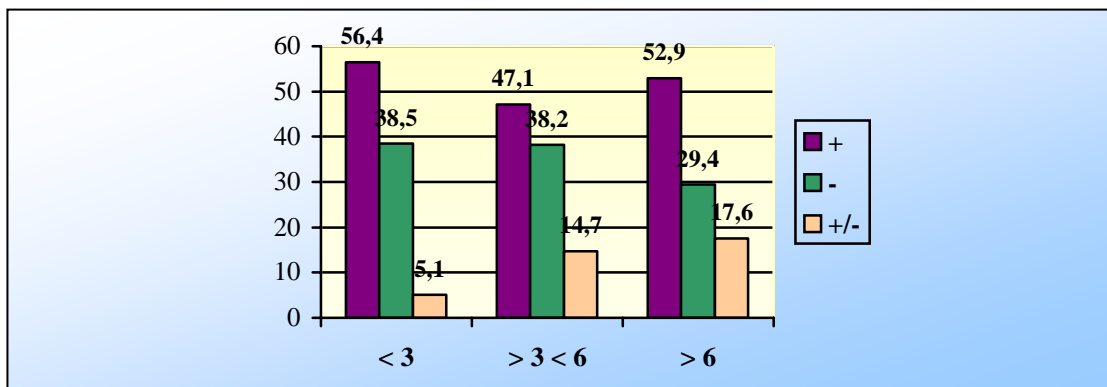
El tamaño tumoral es el primer marcador anatomopatológico en el cual reparamos. (TABLA XV y FIGURA 9).

TABLA XV

	$\leq 3\text{cm}$	$> 3\text{cm} \leq 6\text{ cm}$	$> 6\text{ cm}$
+	22	16	9
-	15	13	5
+/-	2	5	3

Positividad para *HSP 27* en función del diámetro tumoral. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 27*; \mp : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 27*; +/-: Tumores + o - para *HSP 27* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++; $\leq 3\text{cm}$: Tumores de diámetro menor o igual a 3cm; $>3\text{cm} \leq 6\text{cm}$: Tumores de diámetro mayor de 3cm y menor o igual a 6cm; $>6\text{cm}$: Tumores de diámetro mayor de 6 cm.

FIGURA 9:



Positividad para *HSP 27* en función del tamaño del tumor. ±: Tumores altamente positivos para *HSP 27*; -: Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 27*; +/-: Tumores + o - para *HSP 27* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++; < 3: Tumores de diámetro menor o igual a 3cm; ≥ 3 < 6: Tumores de diámetro mayor de 3cm y menor o igual a 6cm; ≥ 6: Tumores de diámetro mayor de 6 cm. Datos expresados de forma porcentual.

Valorando los resultados expuestos en la tabla XV y figura 9 hallamos que el 38.5% de los tumores de menos de 3 cm fueron negativos o de baja positividad para *HSP 27*. Por su parte, el 38.2% de las neoplasias de 3 a 6 cm de diámetro y el 29.4% de los tumores de más de 6 cm exhibieron una expresión baja o nula para *HSP 27* en términos de extensión e intensidad. La heterogeneidad hallada en los datos nos lleva a sospechar que la falta de expresión de *HSP 27* se ve influenciada por los tumores de menor diámetro. No obstante, la estadística no fue capaz de demostrar ninguna asociación entre ambas variables ($p > 0.05$).

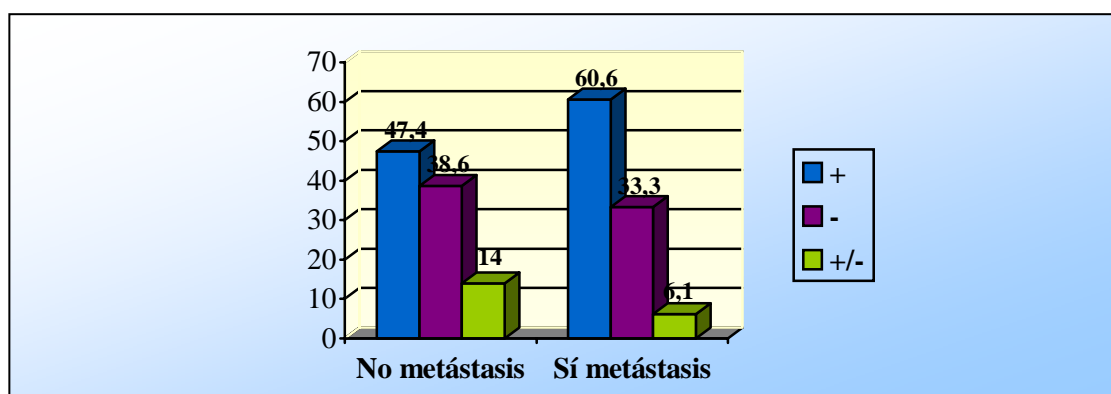
La tabla XVI y figura 10 representan los datos que relacionan la demostración inmunohistoquímica de *HSP 27* sobre las muestras tumorales junto a la existencia o ausencia de afectación ganglionar.

TABLA XVI

	No metástasis	Sí metástasis
+	27	20
-	22	11
+/-	8	2

Positividad para *HSP 27* en función de la afectación de los ganglios linfáticos regionales. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 27*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 27*; +/-: Tumores + o - para *HSP 27* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++.

FIGURA 10:



Positividad para *HSP 27* en función de los ganglios linfáticos regionales afectados. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 27*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 27*; +/-: Tumores + o - para *HSP 27* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++.

Datos expresados de forma porcentual.

La proteína *HSP 27* ha quedado demostrada con una elevada positividad en un 60.6% (20/33) de los casos que metastatizaron a alguno/s de los ganglios linfáticos regionales. Mientras, el 47.4% (27/57) de los casos que no invadieron los ganglios adyacentes mostró una alta expresión en términos de extensión e intensidad para la misma proteína de estrés. Tales datos descriptivos nos llevan a asociar la falta de expresión de *HSP 27* con los tumores que no muestran

afectación ganglionar. Sin embargo, el test Chi-cuadrado aplicado establece una vez más que las diferencias observadas no son lo suficientemente significativas como para confirmar la existencia de tal asociación ($p > 0.05$).

El antígeno de bajo peso molecular fue analizado con relación al tipo tumoral con que fue diagnosticado cada uno de los 90 pacientes integrantes de nuestro estudio. (TABLAS XVII Y XVIII).

TABLA XVII
TIPOS TUMORALES

	CARCINOMAS EPIDERMOIDES	ADENO- CARCINOMAS	C. ADENO- ESCAMOSOS	C.I.C. GRANDES	C.I.C. PEQUEÑAS	CARCINOIDES
CASOS+/ Nº TOTAL	49/51	18/25	1/2	4/6	0/1	5/5
% CÉLULAS MARCADAS	R: 5-100% ξ: 60.20% σ: 36.79%	R: 5-100% ξ: 42.22% σ: 37.85%	R: 5% ξ: 5% σ: 0%	R: 10-100% ξ: 47.5% σ: 41.12%	0%	R: 10-100% ξ: 80.0% σ: 39.37%
INTENSIDAD	7 + 2 ++ 6 +++ 3 +/++ 18 ++/++++ 13 +/+++	3 + 4 ++ 1 +++ 1 +/++ 5 ++/++++ 4 +/+++	1 + 0 ++ 0 +++ 0 +/++ 0 ++/++++ 0 +/+++	0 + 1 ++ 0 +++ 0 +/++ 0 ++/++++ 3 +/+++	-	2 + 0 ++ 0 +++ 1 +/++ 0 ++/++++ 2 +/+++

C.I.C. Grandes: Carcinomas Indiferenciados de células Grandes; C.I.C. Pequeñas: Carcinomas Indiferenciados de Células Pequeñas; C. Adenoescamosos: Carcinomas Adenoescamosos; Casos +/Nº Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado tipo tumoral con respecto del total; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/++ (débil-moderado), ++/++++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte).

TABLA XVIII

TIPOS TUMORALES

	CARCINOMAS EPIDERMOIDES	ADENO- CARCINOMAS	C.ADENO- ESCAMOSOS	C.I.C. GRANDES	C.I.C. PEQUEÑAS	CARCIONOIDES
Nº TOTAL CASOS	51	25	2	6	1	5
+	33 (64.7%)	8 (32.0%)	0 (0%)	2 (33.3%)	0 (0%)	4 (80.0%)
-	11	15	2	3	1	1
+/-	7	2	0	1	0	0

C.I.C. Grandes: Carcinomas Indiferenciados de Células Grandes.; C.I.C. Pequeñas: Carcinomas Indiferenciados de Células Pequeñas; C. Adenoescamosos: Carcinomas Adenoescamosos; Nº Total Casos: Nº de casos analizados y pertenecientes a cada tipo tumoral; (+): Nº de casos altamente positivos en el tejido tumoral; (-): Nº de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral.; (+/-): Nº de casos cuya positividad (alta, baja o negativos) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 27* expresado de forma porcentual.

Ambas tablas (*TABLAS XVII Y XVIII*) muestran unos resultados que contrastan de forma importante con los datos observados hasta este momento y correspondientes al análisis de la proteína *HSP 70*.

En el estudio del antígeno *HSP 27* nos encontramos con un aumento considerable en el número de neoplasias que no mostraban marcaje alguno tras la aplicación del anticuerpo correspondiente. Un total de 13 casos resultaron ser totalmente negativos (no presentaron ninguna célula tumoral marcada) viéndose incrementado de forma considerable este dato con respecto a lo observado para la proteína *HSP 70*. De las 13 muestras que resultaron ser negativas 7, es decir más de la mitad, pertenecían al grupo de tumores diagnosticados como adenocarcinomas. (*TABLA XVII*). La prueba de significación estadística aplicada

establece la existencia de diferencias de marcaje entre los tipos neoplásicos considerados ($p < 0.05$).

La tabla XVII muestra que el porcentaje de células teñidas y contadas por caso estudiado oscilaba en todos los tipos neoplásicos dentro de un amplio rango (desde un 5% hasta un 100%). Los valores medios (ξ) que hacen referencia a tal porcentaje son del 60.20% ($\sigma = 36.79\%$) para los tumores clasificados como carcinomas epidermoides, 42.22% ($\sigma = 37.85\%$) para los adenocarcinomas, 5% ($\sigma = 0\%$) para el único carcinoma adenoescamoso que mostró marcaje, 47.50% ($\sigma = 41.12\%$) para los carcinomas indiferenciados de células grandes y 80% ($\sigma = 39.37\%$) para los carcinoides. El único caso diagnosticado como carcinoma indiferenciado de células pequeñas no mostró tinción alguna para la proteína de estrés de bajo peso molecular. El estadístico aplicado en este caso no demostró relación entre las variables tipo tumoral y porcentaje medio de células marcadas ($p > 0.05$). Por otra parte, tales índices medios (ξ) contrastan con los valores representados en apartados previos y correspondientes a la proteína *HSP 70*. Y es que, la proteína de estrés de bajo peso molecular es demostrada inmunohistoquímicamente con promedios (ξ) inferiores a los hallados para *HSP 70*. En cuanto a la intensidad del marcaje correspondiente a la proteína *HSP 27* esta resultó ser ampliamente variable en todos los tipos neoplásicos. La localización intracelular de la inmunotinción fue siempre citoplásmica.

La tabla XVIII representa los resultados referentes al mismo apartado expresados de un modo diferente. El número de casos considerados como altamente positivos disminuye drásticamente hasta un 52.2% (47 casos altamente positivos de un total de 90 analizados) en relación con los resultados obtenidos en el estudio de la proteína *HSP 70*. Asimismo, centrándonos en cada tipo

tumoral notamos un decaimiento similar. No advertimos ningún tipo de positividad elevada en los casos diagnosticados como carcinomas adenoescamosos y carcinomas indiferenciados de células pequeñas. El resto de tipos neoplásicos (carcinomas epidermoides, adenocarcinomas, carcinomas indiferenciados de células grandes y carcinoides) mostraron porcentajes de positividad inferiores a los demostrados para la proteína de alto peso molecular. Así, un alto grado de positividad para la proteína *HSP 27* fue exhibido en el 64.7% de las neoplasias clasificadas como carcinomas epidermoides (33 casos altamente positivos de 51), el 32% de los adenocarcinomas (8 casos altamente positivos de 25), el 33.3% de los carcinomas indiferenciados de células grandes (2 casos positivos de 6) y el 80% de los carcinoides (4 casos altamente positivos de 5). Una vez más, las diferencias de expresión del antígeno *HSP 27* entre los diferentes tipos tumorales descritos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La foto 17 refleja un carcinoma epidermoide cuyas células neoplásicas muestran positividad para el antígeno de bajo peso molecular.

La foto 18 representa un carcinoma epidermoide marcado citoplásmicamente para la proteína *HSP 27*. Obsérvese la heterogeneidad de la tinción en donde áreas con una intensidad de marcaje débil se muestran adyacentes a zonas fuertemente positivas.

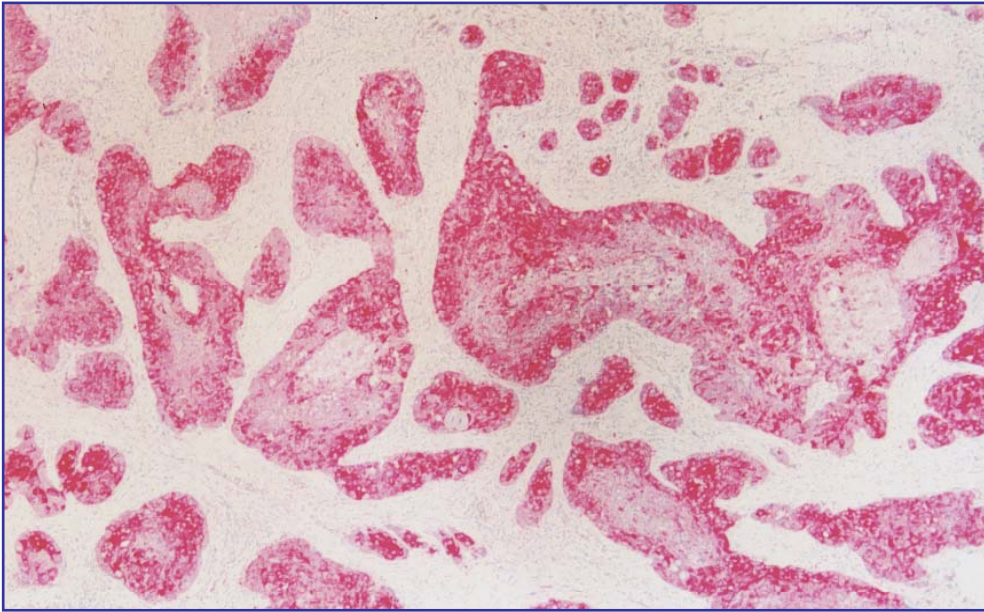


FOTO 17 (Aumentos: 4 x)

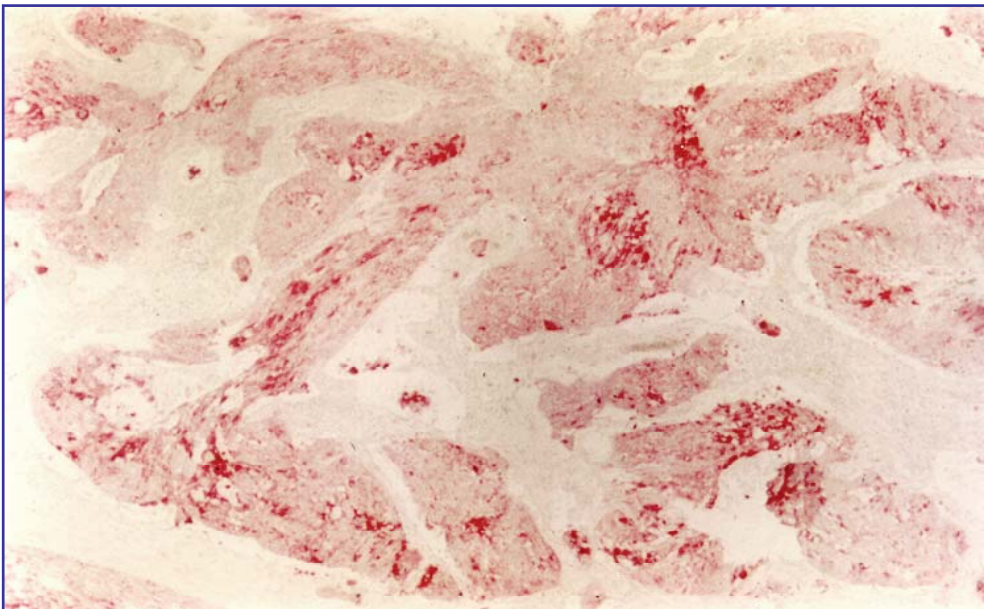


FOTO 18 (Aumentos: 4 x)

HSP 27 también ha sido investigada con relación al grado tumoral. Los datos referidos a esta materia quedan expresados en la tabla XIX y ampliados en la tabla XX.

TABLA XIX

GRADOS TUMORALES

GRADO TUMORAL	CARCINOMAS EPIDERMOIDES				ADENOCARCINOMAS			
	I	II	II/III	III	I	II	II/III	III
CASOS+/N° TOTAL	11/12	29/30	7/7	2/2	6/10	4/6	4/4	4/5
% CÉLULAS MARCADAS	R: 5-100% ξ: 55.45% σ: 41.01%	R: 5-100% ξ: 62.75% σ: 35.62%	R: 10-100% ξ: 57.14% σ: 38.60%	R: 20-100% ξ: 60.00% σ: 56.56%	R: 5-100% ξ: 51.66% σ: 40.08%	R: 5-100% ξ: 40.00% σ: 45.27%	R: 5-80% ξ: 28.75% σ: 34.73%	R: 5-100% ξ: 43.75% σ: 41.90%
INTENSIDAD	3 + 0 ++ 0 +++ 1 +/+ 4 ++/+ 3 +/+	3 + 2 ++ 4 +++ 2 +/+ 9 ++/+ 9 +/+	0 + 0 ++ 1 +++ 0 +/+ 5 ++/+ 1 +/+	1 + 0 ++ 1 +++ 0 +/+ 0 ++/+ 0 +/+	2 + 0 ++ 0 +++ 0 +/+ 2 ++/+ 2 +/+	1 + 1 ++ 0 +++ 0 +/+ 1 ++/+ 1 +/+	0 + 2 ++ 1 +++ 0 +/+ 1 ++/+ 0 +/+	0 + 1 ++ 0 +++ 1 +/+ 1 ++/+ 1 +/+

Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado grado tumoral con respecto del total; % Células Marcadas: Promedio de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/+ (débil-moderado), ++/+ (moderado-fuerte), +/+ (débil-fuerte).

La tabla XIX nos ofrece interesantes datos. El antígeno *HSP 27* se distribuye en carcinomas epidermoides de alto, medio y bajo grado histológico dentro de amplios rangos y con índices de dispersión (σ) que caracterizan a conjuntos poco agrupados en torno a la media central (ξ). Tal comportamiento es similar para los tumores clasificados como adenocarcinomas. El promedio de células teñidas por caso se mantiene en los dos tipos neoplásicos de un modo independiente del

grado tumoral ($p>0.05$). La intensidad de la tinción se muestra una vez más ampliamente variable en todos los grados histológicos considerados.

TABLA XX

GRADOS TUMORALES

GRADO TUMORAL	CARCINOMAS EPIDERMOIDES				ADENOCARCINOMAS			
	I	II	II/III	III	I	II	II/III	III
Nº TOTAL CASOS	12	30	7	2	10	6	4	5
+	6 (50%)	21 (70%)	5 (71.4%)	1 (50%)	2 (20%)	2 (33.3%)	2 (50%)	2 (40%)
-	4	6	0	1	6	4	2	3
+/-	2	3	2	0	2	0	0	0

Nº Total Casos: Nº de casos analizados y pertenecientes a cada grado tumoral; (+): Nº de casos altamente positivos en el tejido tumoral; (-): Nº de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral; (+/-): Nº de casos cuya positividad (alta, baja o negativa) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 27* expresado de forma porcentual.

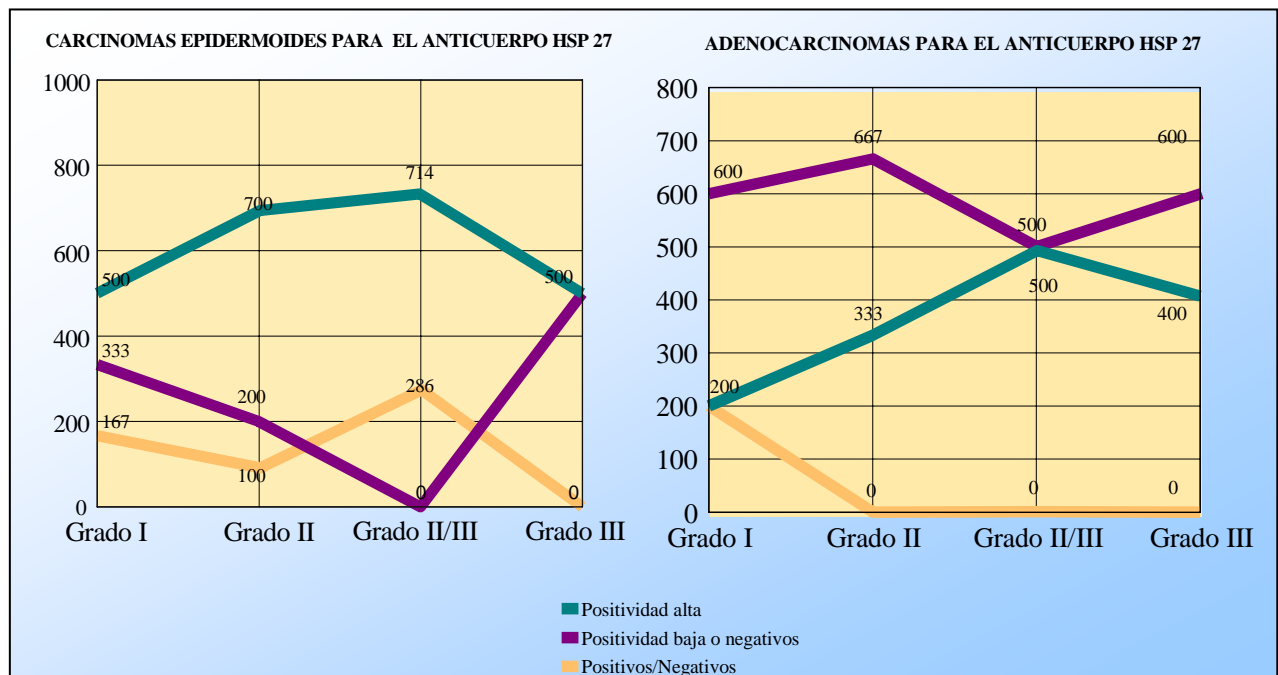
No obstante, en la tabla XX queda reflejado como a medida que aumenta el grado tumoral en los carcinomas epidermoides el porcentaje de casos altamente positivos sigue un comportamiento ascendente desde un 50% en carcinomas epidermoides de grado I (6 casos + de 12), 70% en carcinomas epidermoides de grado II (21 casos + de 30) y hasta un 71.4% en tumores epidermoides de grado II/III (5 casos + de 7 y ningún caso negativo o de positividad baja). Sin embargo, al analizar los carcinomas epidermoides de grado III observamos que el número

de casos con elevada positividad disminuía hasta un 50% (1 caso + de 2). Quizás, debido a la escasa disponibilidad de casos de alto grado tumoral encontrados en nuestra serie.

El comportamiento de expresión representativo del antígeno *HSP 27* es similar en los adenocarcinomas considerados. El 20% (2/10) de los adenocarcinomas de grado I, el 33.3% (2/6) de los de grado II, el 50% (2/4) de los adenocarcinomas de grado II/III y el 40% (2/5) de los de grado III mostraron una alta positividad correspondiente al antígeno de bajo peso molecular. El pico máximo de expresión se halla una vez más en los tumores de grado II/III. (TABLA XX).

La figura 11 muestra a modo de gráfico los últimos resultados (expresión de *HSP 27* en relación con el grado tumoral en carcinomas epidermoides y adenocarcinomas).

FIGURA 11:



Positividad para *HSP 27* en función del grado tumoral. Positividad alta: Casos altamente positivos en el tejido tumoral para la demostración del antígeno *HSP 27*; Positividad baja o negativos: Casos con positividad baja o negativos en el tejido tumoral para la demostración del antígeno *HSP 27*; Positivos/Negativos: Casos cuya positividad varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de débil a fuerte. Todos los valores de la figura están representados en tantos por mil.

Sin embargo, los grados de significación estadística obtenidos ($p > 0.05$) revelan que los resultados descritos no son significativos. En carcinomas epidermoides y adenocarcinomas no quedó demostrado que la positividad hallada para *HSP 27* sea función del grado neoplásico.

La foto 19 representa un carcinoma epidermoide de bajo grado en donde la proteína de estrés de 27kD se expresa citoplásmicamente sobre las células transformadas. La intensidad de la tinción fue tabulada como variable de débil a moderada.

La foto 20 muestra un carcinoma epidermoide de moderado grado de diferenciación histológica teñido citoplásmicamente para el antígeno *HSP 27*. La intensidad del marcaje es fuerte.

La foto 21 refleja un adenocarcinoma pulmonar de moderado grado. Sus células aparecen marcadas con una intensidad variable de moderada a fuerte para la proteína de bajo peso molecular.

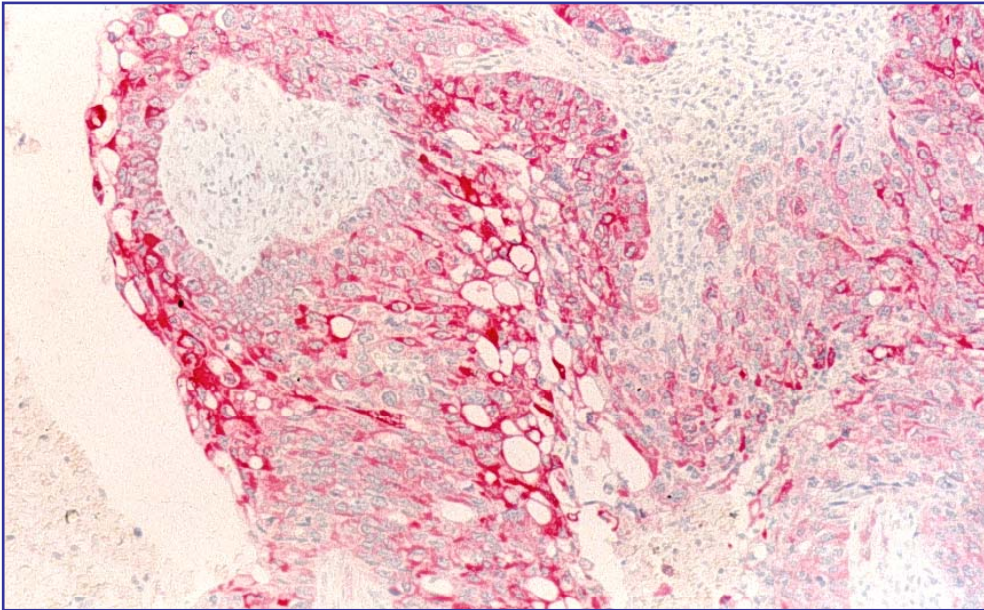


FOTO 19 (Aumentos: 10 x)

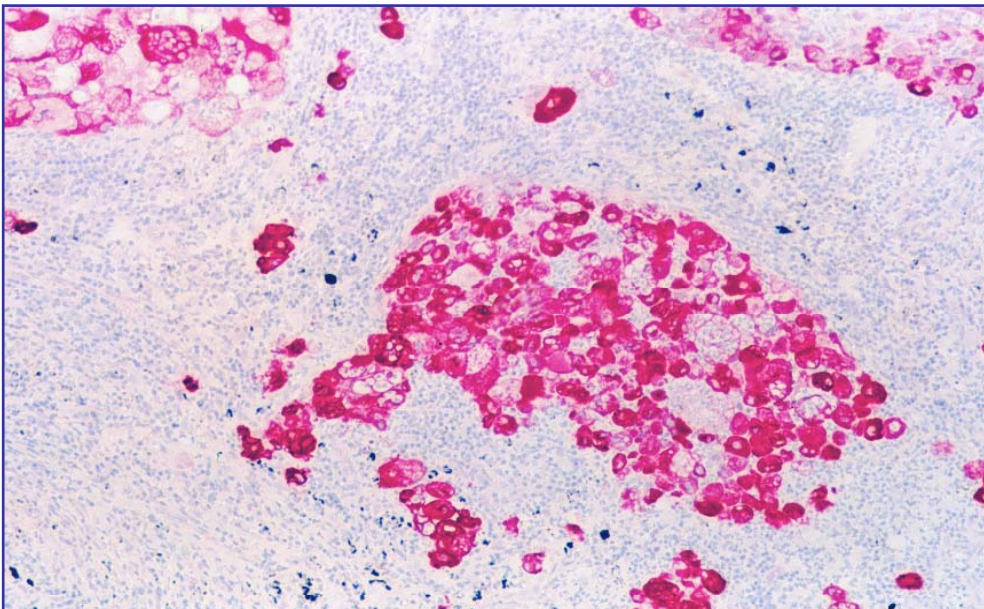


FOTO 20 (Aumentos: 20 x)

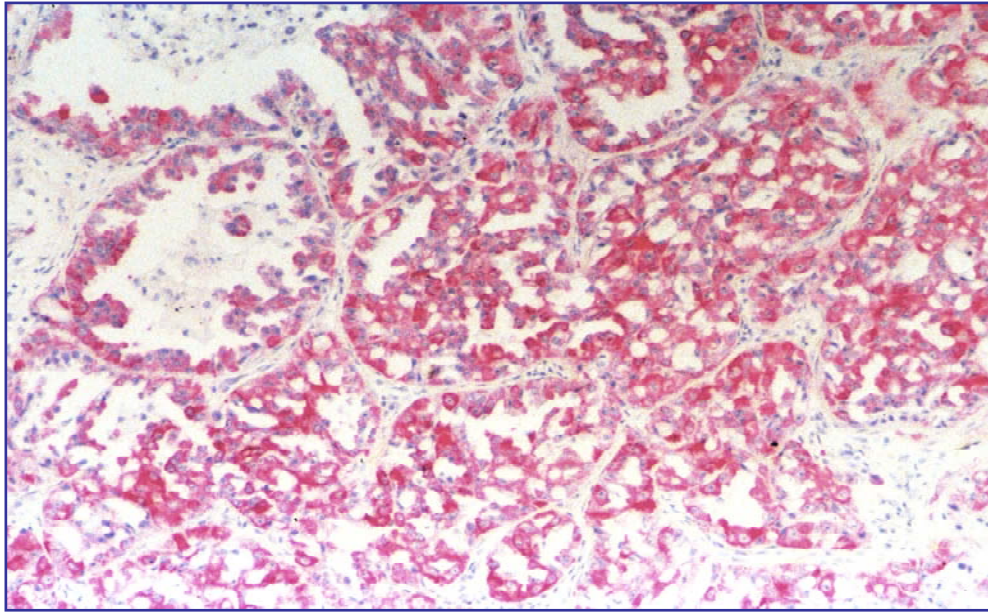


FOTO 21 (Aumentos: 10 x)

La misma operación aplicada en el apartado referido a la proteína *HSP 70* es llevada a cabo ahora para precisar si existe concordancia entre el estadiaje adjudicado a cada caso tumoral y la positividad de las muestras tratadas con el anticuerpo monoclonal anti-*HSP 27*. Como viene siendo habitual los datos quedan remitidos exclusivamente a dos tipos histológicos: Carcinomas epidermoides y Adenocarcinomas. Las tablas XXI y XXII recogen todos los datos al respecto y una representación de los resultados queda expuesta en la figura 12.

TABLA XXI

ESTADIAJES

ESTADIAJE	CARCINOMAS EPIDERMOIDES					ADENOCARCINOMAS				
	I	II	IIIa	IIIb	IV	I	II	IIIa	IIIb	IV
CASOS + / N° TOTAL	28/29	9/10	9/9	1/1	2/2	9/11	0/1	7/11	0/0	2/2
% CÉLULAS MARCADAS	R: 5-100% ξ: 55.35% σ: 35.82%	R: 10-100% ξ: 66.66% σ: 33.16%	R: 5-100% ξ: 66.11% σ: 41.81%	R: 100% ξ: 100% σ: 0%	R: 5-100% ξ: 52.50% σ: 67.17%	R: 5-100% ξ: 36.11% σ: 33.98%	0%	R: 5-100% ξ: 47.14% σ: 40.60%	*	R: 5-100% ξ: 52.50% σ: 67.17%
INTENSIDAD	6 + 0 ++ 2 +++ 2 +/+++ 8 ++/+++ 10 +/+++	0 + 0 ++ 3 +++ 0 +/+++ 5 ++/+++ 1 +/+++	1 + 1 ++ 1 +++ 0 +/+++ 4 ++/+++ 2 +/+++	0 + 0 ++ 0 +++ 0 +/+++ 1 ++/+++ 0 +/+++	0 + 1 ++ 0 +++ 1 +/+++ 0 ++/+++ 0 +/+++	1 + 3 ++ 0 +++ 1 +/+++ 4 ++/+++ 0 +/+++	-	1 + 1 ++ 1 +++ 0 +/+++ 1 ++/+++ 3 +/+++	*	1 + 0 ++ 0 +++ 0 +/+++ 0 ++/+++ 1 +/+++

Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado estadiaje tumoral con respecto del total; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Media; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte).

La tabla XXI revela los rangos, medias y valores de dispersión correspondientes a la expresión de *HSP 27* sobre los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas considerados en función del grado de estadificación tumoral. La intensidad del marcaje también queda expuesta en la misma tabla con carácter de elevada variabilidad.

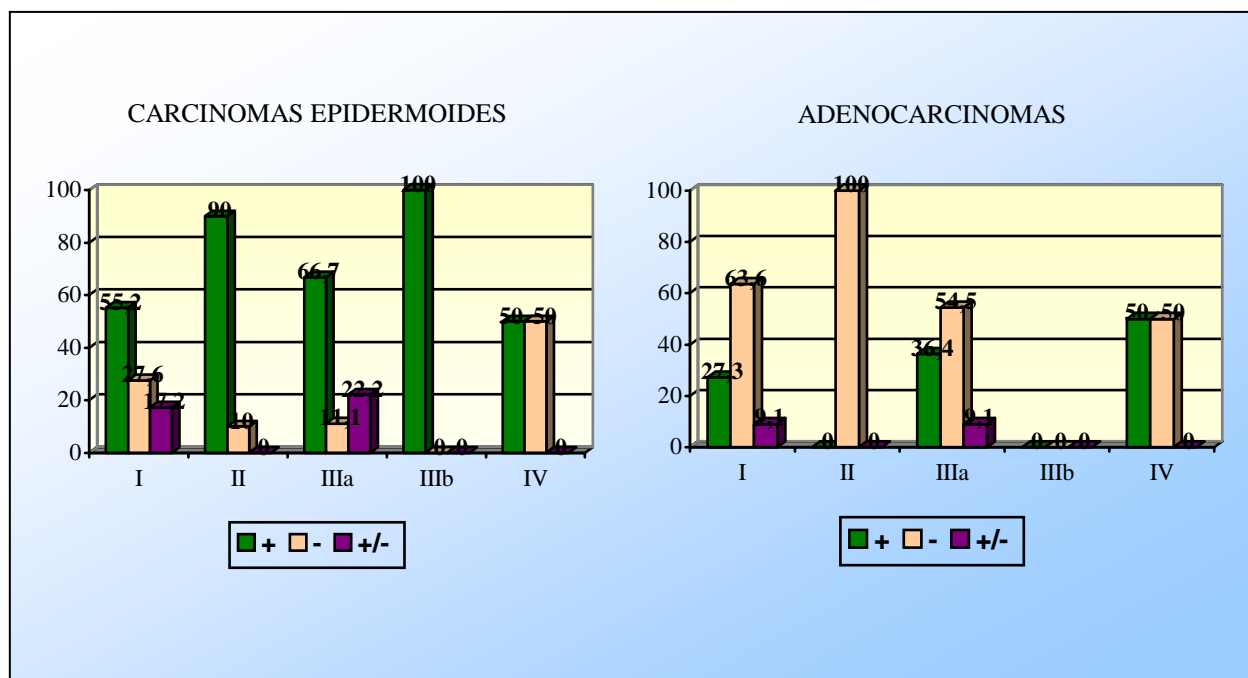
TABLA XXII

ESTADIAJES

ESTADIAJE	CARCINOMAS EPIDERMÓIDES					ADENOCARCINOMAS				
	I	II	IIIa	IIIb	IV	I	II	IIIa	IIIb	IV
N° TOTAL	29	10	9	1	2	11	1	11	0	2
+	16 (55.2%)	9 (90.0%)	6 (66.7%)	1 (100.0%)	1 (50.0%)	3 (27.3%)	0 (0%)	4 (36.4%)	0	1 (50.0%)
-	8	1	1	0	1	7	1	6	*	1
+/-	5	0	2	0	0	1	0	1	*	0

N° Total Casos: N° de casos analizados y pertenecientes a cada estadiaje; (+): N° de casos altamente positivos en el tejido tumoral; (-): N° de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral; (+/-): N° de casos cuya positividad (alta, baja o negativa) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a ++++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 27* expresado de forma porcentual.

FIGURA 12:



Positividad para *HSP 27* en función del estadiaje. \pm : Tumores altamente positivos para *HSP 27*; \pm : Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 27*; \pm : Tumores + o - para *HSP 27* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a ++++. Datos expresados de modo porcentual.

El 27.6% (8/29) de los carcinomas epidermoides con un estadiaje I fueron negativos o débilmente positivos en la demostración de la proteína *HSP 27*. Por su parte, el 10% (1/10) de los de estadiaje II, el 11.1% (1/9) de los estadificados como IIIa, el 0% (0/1) de los llamados IIIb y el 50% (1/2) de los carcinomas de células escamosas de estadiaje IV demostraron ser negativos o de positividad débil para la proteína de choque térmico de bajo peso molecular. (TABLA XXII) (FIGURA 12). Tales resultados nos llevan a concluir que el grado de estadiación de los tumores diagnosticados como carcinomas epidermoides debe influir en la capacidad de expresión de la proteína *HSP 27*. Los tumores de bajo estadiaje sufren pérdida de expresión para la proteína de bajo peso molecular. Por su parte,

el estadístico aplicado fue incapaz de demostrar la existencia de asociación entre las dos variables consideradas ($p>0.05$).

Fijando nuestra atención en las neoplasias clasificadas como adenocarcinomas notamos que tan solo el 27.3% (3/11) de las estadificadas como I muestran una elevada positividad para la proteína *HSP 27*. Por otra parte, la única muestra considerada entre los adenocarcinomas de estadio II resultó ser negativa. Asimismo, el 36.4% (4/11) de los tumores de igual tipo histológico si bien de estadiaje IIIa manifestó una pronunciada inmunolocalización de *HSP 27*. Por último, el 50% (1/2) de los adenocarcinomas estadificados como IV demostró una amplia distribución de la misma proteína de estrés. Considerando exclusivamente los estadijes más representativos debido al mayor número de casos integrantes podríamos deducir de nuevo que los tumores de estadiaje más alto son capaces de mostrar una mayor positividad para la proteína *HSP 27*. (TABLA XXII) (FIGURA 12). Sin embargo, las diferencias halladas podrían ser explicadas por el azar ($p>0.05$).

Por otra parte, una detenida observación de la tabla XXII nos lleva a determinar que los niveles de expresión proteica manifestados en los carcinomas epidermoides son bien diferentes de los valores contemplados entre las neoplasias clasificadas como adenocarcinomas. Y es que, los carcinomas epidermoides de estadiaje I muestran una elevada inmunolocalización proteica con un promedio que dobla los valores manifestados entre los adenocarcinomas del mismo estadiaje. Un comportamiento similar distingue a los tumores de estadiaje IIIa.

Siguiendo la misma dinámica de trabajo aplicada hasta el momento nos disponemos a valorar la posible relación que pudiera existir entre la expresión de la proteína de estrés de bajo peso molecular y los estados de supervivencia estimados. Como apoyo para tal análisis nos valemos de las tablas de contingencia XXIII y XXIV. Al mismo tiempo, la figura 13 nos ofrece una representación gráfica de los resultados más relevantes.

TABLA XXIII

ESTADOS DE SUPERVIVENCIA

ESTADO DE SUPERVIVENCIA	CARCINOMAS EPIDERMOIDES			ADENOCARCINOMAS		
	VIVOS		MUERTOS	VIVOS		MUERTOS
	LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES		LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES	
CASOS + / N° TOTAL	18/18	5/5	26/28	10/11	1/2	7/12
% CÉLULAS MARCADAS	R: 5-100% ξ: 53.05% σ: 33.65%	R: 60-100% ξ: 86.00% σ: 16.73%	R: 5-100% ξ: 60.19% σ: 40.18%	R: 5-100% ξ: 46.00% σ: 39.14%	R: 100% ξ: 100% σ: 0%	R: 5-80% ξ: 28.57% σ: 31.05%
INTENSIDAD	3 + 0 ++ 3 +++ 1 +/++ 7 ++/+++ 4 +/+++	0 + 0 ++ 0 +++ 0 +/++ 1 ++/+++ 4 +/+++	4 + 2 ++ 3 +++ 2 +/++ 10 ++/+++ 5 +/+++	1 + 2 ++ 1 +++ 1 +/++ 3 ++/+++ 2 +/+++	0 + 0 ++ 0 +++ 0 +/++ 0 ++/+++ 1 +/+++	2 + 2 ++ 0 +++ 0 +/++ 2 ++/+++ 1 +/+++

Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje para un determinado estado de supervivencia con respecto del total; % Células Marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; ξ: Média; σ: Desviación Típica); Intensidad: Intensidad de marcaje: + (débil), ++ (moderado), +++ (fuerte), +/++ (débil-moderado), ++/+++ (moderado-fuerte), +/+++ (débil-fuerte).

La proteína *HSP 27* se pone de manifiesto en la totalidad de los carcinomas epidermoides correspondientes a pacientes vivos (libres de enfermedad y recidivantes). La media de células neoplásicas teñidas para el marcador de bajo peso molecular es del 53.05% ($\sigma=33.65\%$) para los individuos libres de enfermedad y del 86% ($\sigma=16.73\%$) para los recidivantes. Tan solo dos muestras diagnosticadas como carcinomas epidermoides eludieron la presencia del antígeno correspondiéndose con pacientes que murieron a consecuencia del tumor. El porcentaje medio de células marcadas para tal grupo fue del 60.19% ($\sigma=40.18\%$). Un grado de significación estadística mayor de 0.05 nos lleva a aceptar la hipótesis nula bajo cuyo enunciado el porcentaje medio de células marcadas para *HSP 27* no está asociado al estado de supervivencia. Por otra parte, la intensidad de expresión del marcador *HSP 27* es altamente variable de débil a fuerte en todos los estados de supervivencia estimados. (TABLA XXIII).

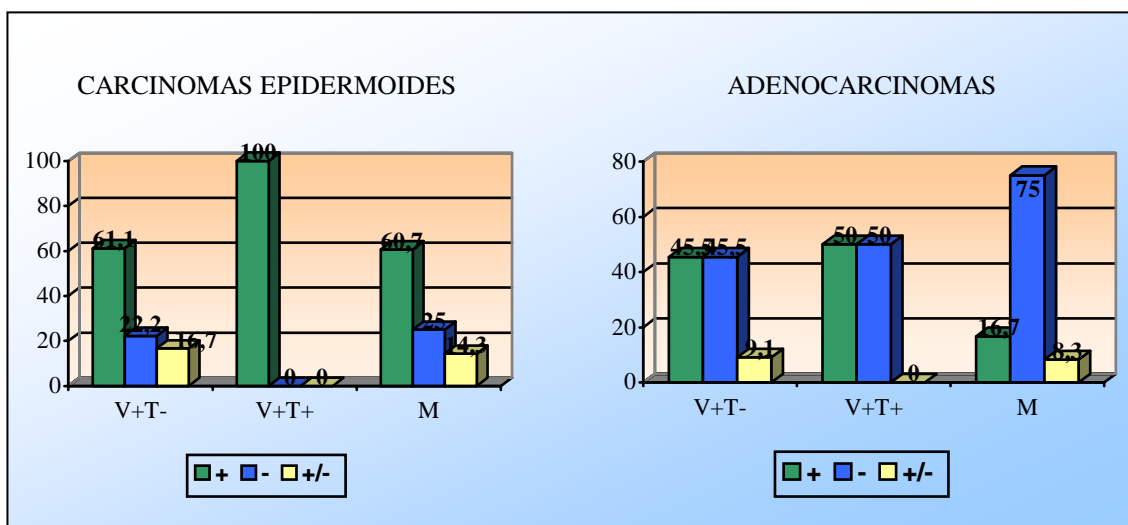
10 de los 11 adenocarcinomas clasificados como vivos y libres de enfermedad manifestaron tinción para la proteína de estrés *HSP 27*. El promedio de células neoplásicas marcadas para tal grupo fue del 46%. Por su parte, tan solo una muestra de las dos correspondientes a pacientes recidivantes mostró marcaje proteico. El marcaje se extendió al 100% de las células del tumor. 7 de los 12 adenocarcinomas correspondientes a pacientes que murieron muestran tinción proteica con un porcentaje medio de células marcadas ($\xi=28,57\%$) disminuido en relación con los estados de supervivencia más favorables. Sin embargo, el estadístico aplicado no fue capaz de demostrar los valores observados ($p>0.05$). Una vez más, la intensidad del marcaje resultó ser ampliamente variable en los tres estados de supervivencia considerados. (TABLA XXIII).

TABLA XXIV
ESTADOS DE SUPERVIVENCIA

ESTADO DE SUPERVIVENCIA	CARCINOMAS EPIDERMOIDES			ADENOCARCINOMAS		
	VIVOS		MUERTOS	VIVOS		MUERTOS
	LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES		LIBRES DE ENFERMEDAD	RECIDIVANTES	
Nº TOTAL CASOS	18	5	28	11	2	12
+	11 (61.1%)	5 (100%)	17 (60.7%)	5 (45.5%)	1 (50%)	2 (16.7%)
-	4	0	7	5	1	9
+/-	3	0	4	1	0	1

Nº Total Casos: Nº de casos analizados y pertenecientes a cada estado de supervivencia; (+): Nº de casos altamente positivos en el tejido tumoral; (-): Nº de casos negativos o de baja positividad en el tejido tumoral; (+/-): Nº de casos cuya positividad (alta, baja o negativa) varía dependiendo de la intensidad del marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a ++++. Entre paréntesis se define el número de casos altamente positivos para la proteína *HSP 27* expresado de forma porcentual.

FIGURA 13:



Positividad para *HSP 27* en función del estado de supervivencia. V+T-: Pacientes vivos y libres de enfermedad; V+T+: Pacientes vivos con tumor recidivante; M: Muertos. +: Tumores altamente positivos para *HSP 27*; -: Tumores negativos o débilmente positivos para *HSP 27*; +/-: Tumores + o - para *HSP 27* en función de la intensidad de marcaje adjudicada cuando esta era altamente variable de + a +++. Datos expresados de modo porcentual.

La tabla XXIV y figura 13 muestran los resultados obtenidos en términos de positividad. Los carcinomas epidermoides diagnosticados sobre pacientes que han evolucionado hasta un estado libre de enfermedad muestran una positividad similar a los mismos tumores correspondientes a pacientes que murieron a causa del tumor. Así, el 61.1% (11/18) de los individuos libres de tumor mostraban una positividad alta para la proteína de estrés *HSP 27*. De manera equiparable, el 60.7% (17/28) de los pacientes que murieron manifestaron un alto grado de positividad para el mismo antígeno. Sin embargo, el 100% (5/5) de los individuos recidivantes exhibió una positividad elevada correspondiente al marcador de 27 kD. En este caso, el test de Chi-cuadrado aplicado no fue capaz de demostrar la hipótesis alternativa ($p > 0.05$).

Seguidamente interpretamos los resultados que hacen referencia a los casos clasificados como adenocarcinomas. De este modo hallamos una elevada positividad para *HSP 27* en el 45.5% (5/11) de los adenocarcinomas diagnosticados sobre pacientes que evolucionaron hasta un estado libre de enfermedad. Asimismo, el 50% (1/2) de los individuos recidivantes manifestó una elevada tinción en términos de extensión e intensidad. Por último, se estima que tan solo el 16.7% (2/12) de los individuos que murieron a consecuencia del tumor ofrecieron muestras de elevada positividad tumoral. (TABLA XXIV) (FIGURA 13). Los datos obtenidos nos llevan a estimar que al menos en adenocarcinomas la pérdida de expresión se asocia con los estados de supervivencia menos alentadores a pesar de que desde el punto de vista estadístico los resultados no fueran significativos ($p>0.05$).

3.3.-DIFERENCIAS DE INMUNOMARCAJE ENTRE TEJIDO BRONCOPULMONAR NORMAL Y NEOPLÁSICO:

TABLA XXV

	CASOS +/- Nº TOTAL	% CEL. MARCADAS			INTENSIDAD						
		R (%)	X (%)	σ (%)	+	++	+++	+ / ++	++ / +++	+ / +++	
TEJIDO TUMORAL	89/90	10-100	86.06	23.72	14	9	5	35	11	15	
TEJIDO NORMAL CENTRAL	Epitelio Bronquial	13/14	10-100	62.69	27.43	6	2	1	0	3	1
	Células Caliciformes	0/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Basales	3/14	20-80	46.66	30.55	1	0	0	0	2	0
	Glándulas Serosas	5/13	5-70	33.00	24.39	4	0	0	1	0	0
	Glándulas Mucosas	4/13	15-100	46.25	39.02	3	0	0	0	0	1
	Células Ductales	10/14	5-100	35.00	29.34	5	1	1	2	1	0
	Células Basales Ductales	0/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Músculo Bronquial	6/10	10-70	35.83	25.38	6	0	0	0	0	0	
TEJIDO NORMAL PERIFÉRICO	Epitelio Bronquiolar	35/38	5-100	49.85	25.04	12	7	4	2	8	2
	Células Caliciformes	0/38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Reserva	0/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neumocitos Tipo I	0/51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neumocitos Tipo II	32/51	5-60	18.59	15.51	17	5	0	8	0	2
	Macrófagos Alveolares	0/51	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Capilares Septales	0/51	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Marcaje para *HSP 70* en tejido pulmonar neoplásico y normal. Casos +/- Nº Total: Número de casos que muestran marcaje con respecto del total; % Células marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; X: Media; σ : Desviación típica); Intensidad: Intensidad del marcaje: + (débil), ++ (moderada), +++ (fuerte), + / ++ (débil-moderada), ++ / +++ (moderada-fuerte), + / +++ (débil-fuerte).

Un total de 89 tumores de los 90 analizados mostraron inmunomarcaje para la proteína *HSP 70*. Tal valor se corresponde con una frecuencia de expresión del 98.9%. El porcentaje medio de células neoplásicas marcadas por caso fue del 86.06%. Por otra parte, 14 tumores mostraron una intensidad de tinción débil, 9 moderada, 5 fuerte, 35 débil-moderada, 11 moderada-fuerte y 15 débil-fuerte. Los mismos valores de frecuencia, extensión e intensidad han sido estimados en cada una de las estructuras broncopulmonares normales consideradas de forma

habitual en este trabajo. La proteína *HSP 70* ha sido demostrada con una elevada frecuencia de expresión en determinadas estructuras normales (epitelio ciliado de vías aéreas gruesas, epitelio no mucosecretor de vías aéreas finas, células ductales, músculo bronquial y neumocitos tipo II). Sin embargo, y en ningún caso, se sobrepasaron las estimaciones realizadas sobre el tejido tumoral. Del mismo modo, los tejidos normales expresan la proteína de 70kD con una menor extensión que los tejidos neoplásicos. El epitelio ciliado bronquial constituye la estructura normal con mayor extensión de marcaje. No obstante, el porcentaje medio de células ciliadas marcadas no sobrepasa la media estimada sobre los tumores. Por otra parte, evaluamos la intensidad con que fue demostrada la proteína de elevado peso molecular. Como resultado de tal valoración demostramos que los tejidos neoplásicos manifiestan la proteína *HSP 70* con una mayor intensidad de tinción que las estructuras broncopulmonares normales.

(*TABLA XXV*).

TABLA XXVI

	CASOS +/ N° TOTAL	% CÉL. MARCADAS			INTENSIDAD						
		R (%)	X (%)	σ (%)	+	++	+++	+ / ++	++ / +++	+ / +++	
TEJIDO TUMORAL	77/90	5-100	55.90	38.16	13	7	7	5	23	22	
TEJIDO NORMAL CENTRAL	Epitelio Bronquial	2/21	10	10.00	0.00	1	1	0	0	0	0
	Células Caliciformes	0/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Basales	12/21	5-70	30.83	22.71	9	1	1	1	0	0
	Glándulas Serosas	2/14	5-10	7.50	3.53	2	0	0	0	0	0
	Glándulas Mucosas	1/14	10	10.00	0.00	1	0	0	0	0	0
	Células Ductales	6/14	10-50	30.83	18.00	3	0	1	2	0	0
	Células Basales Ductales	1/14	80	80.00	0.00	0	0	1	0	0	0
Músculo Bronquial	10/13	10-90	56.00	29.51	5	4	0	1	0	0	
TEJIDO NORMAL PERIFÉRICO	Epitelio Bronquiolar	22/41	5-70	24.09	20.73	16	1	0	4	1	0
	Células Caliciformes	0/41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Reserva	0/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neumocitos Tipo I	0/60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neumocitos Tipo II	28/60	5-70	16.96	17.12	19	4	1	4	0	0
	Macrófagos Alveolares	1/60	70	70	0.00	1	0	0	0	0	0
	Capilares Septales	1/60	35	35	0.00	0	1	0	0	0	0

Marcaje para *HSP 27* en tejido pulmonar neoplásico y normal. Casos +/N° Total: Número de casos que muestran marcaje con respecto del total; % Células marcadas: Porcentaje de células que aparecieron marcadas por caso (R: Rango; X: Media; σ : Desviación típica); Intensidad: Intensidad del marcaje: + (débil), ++ (moderada), +++ (fuerte), + / ++ (débil-moderada), ++ / +++ (moderada-fuerte), + / +++ (débil-fuerte).

La proteína *HSP 27* ha sido inmunolocalizada en 77 tejidos tumorales de los 90 analizados (85.6%). La misma proteína ha sido demostrada en ciertas estructuras broncopulmonares normales. No obstante, queda claramente definida una menor frecuencia de marcaje sobre estas últimas. Por otra parte, hemos valorado la extensión del marcaje. Los tejidos neoplásicos mostraron un promedio de células marcadas por caso del 55.90%. En ningún caso las estructuras normales superaron tal valor. Igualmente hemos evaluado la intensidad del marcaje tanto en tejidos tumorales como normales. Así, 13 neoplasias mostraron una intensidad de tinción débil, 7 moderada, 7 fuerte, 5 débil-moderada, 23 moderada-fuerte y 22 débil-fuerte. Sin embargo, el número de casos con intensidad de tinción débil es mayor sobre las estructuras broncopulmonares normales. (TABLA XXVI).

Con estos resultados demostramos la existencia de una marcada diferencia de inmunomarcaje entre tejidos tumorales y normales. Los tejidos neoplásicos exhiben las proteínas de choque térmico de 70 y 27kD con mayor frecuencia, extensión e intensidad que cada una de las estructuras broncopulmonares normales consideradas en este trabajo.

IV.-DISCUSIÓN

IV.-DISCUSIÓN

En esta sección reflexionaremos a cerca de los datos que han quedado reflejados en apartados previos para seguidamente contrastarlos de una manera razonada y argumentada con las opiniones e hipótesis de otros autores. El último paso será obtener unas conclusiones que resuman claramente las nuevas aportaciones que este trabajo puede añadir a la información recogida hasta ahora en la literatura.

4.1.-ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS UTILIZADOS:

Algo que parece claro es que en función del empleo de unos materiales y métodos u otros ante la puesta en marcha de una técnica (en nuestro caso inmunohistoquímica) los resultados obtenidos podrán verse afectados en mayor o menor medida. Por esta razón es importante hacer siempre y en primer lugar una valoración exhaustiva de los protocolos, materiales, sistemas e incluso procedimientos de valoración de los resultados que mejor se integren en el trabajo a realizar. En todo estudio inmunohistoquímico valoraremos cuales son los fijadores, anticuerpos, sistemas de detección, etc. que proporcionan los resultados más reales. Sin embargo y para llegar hasta este punto habremos determinado con antelación cual es la técnica más adecuada en el desarrollo de cada tesis. La elección en nuestro caso de la inmunohistoquímica ha implicado valorar cuales son las ventajas y desventajas que nos ofrece la técnica.

La integración de las técnicas inmunohistoquímicas en los laboratorios de Anatomía Patológica ha supuesto un avance importante, sobretodo ante la aparición de un gran número de constituyentes celulares considerados como antígenos o marcadores tumorales, cuya detección en ciertas medidas e intensidades sobre algunas estructuras tisulares parece ser fundamental para obtener un diagnóstico acertado. Las técnicas inmunohistoquímicas aplicadas en patología tumoral pueden contribuir a conocer mejor la histogénesis de las neoplasias, realizar subclasificaciones taxonómicas de los distintos tipos tumorales, señalar el posible carácter funcional de una lesión tumoral indicando los productos que segrega e identificar probables agentes etiológicos (virus) todo ello utilizando amplios paneles de anticuerpos. *(257).

Las proteínas de choque térmico a las que dedicamos nuestra atención en este trabajo han sido investigadas a lo largo de la literatura a través del empleo de muy diferentes técnicas. Sin embargo, la inmunohistoquímica es capaz de prestarnos algunas informaciones a cerca de tales antígenos que otras técnicas no ofrecen. Sin duda, la ventaja mas destacada que nos aporta la inmunohistoquímica es el hecho de poder llevar a cabo un estudio morfológico del patrón de marcaje obtenido (localización intracelular, distribución, intensidad, porcentaje de células positivas, etc.). Así, los métodos inmunohistoquímicos se establecen como técnicas de inmunolocalización. *(257).

Thor A. y sus colaboradores llevan a cabo el análisis de la proteína *HSP 27* sobre carcinomas primarios de mama a tres niveles:

- Detección del *ARNm HSP 27* a través de técnicas Northern Blots.
- Detección de la proteína *HSP 27* por análisis Western Blots.

- Análisis inmunohistoquímico de la proteína *HSP 27* a partir de cortes histológicos fijados en formalina y embebidos en parafina.

Los dos primeros ensayos aplicados en el trabajo de *Thor A.* ofrecían datos semicuantitativos ante la visualización directa de los Northern y Western Blots seguida de una confirmación de los resultados por densitometría. Paralelamente los análisis inmunohistoquímicos permitían mostrar el porcentaje de células inmunoreactivas así como la intensidad del marcaje a través de la visualización directa de la inmunotinción proteica en las células. Además, la detección inmunohistoquímica de *HSP 27* fue consonante con la determinación de su expresión tanto por Northern como por Western Blots. Los resultados obtenidos con los tres métodos fueron concordantes y confirmaban la sensibilidad del procedimiento inmunohistoquímico. **(197).*

No obstante, las ventajas de las técnicas inmunohistoquímicas son a veces debatidas. *Bonay M.* y su grupo combinan técnicas inmunohistoquímicas e inmunoelectroforéticas para evaluar la distribución de los 2 miembros de la familia *HSP 70* (*HSP 72*/inducible y *HSP 73*/constitutiva) en pulmón humano. Ambas técnicas dan similares resultados para la proteína *HSP 72*/inducible. Sin embargo, mientras todas las muestras neoplásicas fueron positivas para la proteína *HSP 73*/constitutiva mediante técnicas inmunoelectroforéticas el mismo antígeno no fue detectado en ningún caso por inmunohistoquímica. Quizás, el bloqueo por medio de la interacción con otras proteínas del epítipo implicado en el reconocimiento inmunohistoquímico de la proteína *HSP 73*/constitutiva pueda justificar tal hecho. **(152).*

En cualquier caso ventajas e inconvenientes se enfrentan en un tira y afloja que muchas veces favorece la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para evaluar la expresión de *HSP's in situ* frente a la opción tomada por algunos investigadores que se inclinan por la utilización de técnicas de biología molecular en el análisis de las mismas proteínas.

Una vez más las técnicas inmunohistoquímicas nos ofrecen una nueva cualidad a su favor consecuencia de las propiedades que aportan los 2 primeros pasos con que debemos comenzar cualquier ensayo de este tipo: 1) fijación de la pieza evitando los procesos de autólisis y putrefacción de la misma; 2) inclusión de la muestra en un medio (parafina) que ofrezca una consistencia suficiente como para facilitar su manejo posterior en la obtención de cortes finos. Los tejidos así procesados podrán quedar archivados con el fin de llevar a cabo una rápida aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas correspondientes sobre casos antiguos cuando así sea requerido. ^{*(257)}.

El proceso de fijación del tejido debe ser elegido basándose en varios aspectos como son el tejido a fijar, el tipo de inclusión a realizar, el anticuerpo con el que se vaya a trabajar, etc. ^{*(257)}. Tras la realización de las probatinas correspondientes combinando fijadores, pretratamientos, anticuerpos y sistemas de detección a la vez que ajustando los tiempos y temperaturas de fijación elegimos en nuestro caso 2 tipos de fijadores químicos: a) Formaldehído (el agente fijador considerado como universal que actúa por reticularización de las proteínas); b) Líquido de Carnoy (una mezcla fijadora).

El formaldehído utilizado a una concentración del 10% resultó ser el fijador ideal en la aplicación de las técnicas rutinarias de tinción con Hematoxilina y

Eosina para el estudio morfológico del tejido gracias a algunas de sus características. Es un fijador que conserva bien la estructura tisular, no endurece excesivamente los tejidos y produce una retracción escasa del mismo; tiene acción desinfectante y se usa en el almacenamiento de biopsias y piezas quirúrgicas resultando ser además un fijador económico. ^{*(258)}. En la aplicación del análisis inmunohistoquímico para la detección de la proteína de choque térmico *HSP 27* también se emplearon muestras de tejido pulmonar fijadas en formaldehído. Sin embargo, en el estudio del antígeno *HSP 70* resultó ser más adecuado el empleo de la mezcla fijadora (Líquido de Carnoy). Cuando se trabaja con anticuerpos monoclonales es importante tener en cuenta que la fijación en formaldehído puede establecer puentes químicos con el antígeno impidiendo su demostración por lo que debe emplearse fijadores alternativos que no actúen por reticularización proteica. El Líquido de Carnoy mezcla en su composición varios agentes con propiedades fijadoras compensando las desventajas de algunos de sus componentes con los beneficios de otros [etanol absoluto y cloroformo (actúan por deshidratación); ácido acético (actúa por cambios en el estado coloidal de las proteínas tisulares)]. ^{*(257)}.

En inmunohistoquímica la fijación y desnaturalización proteica están estrechamente relacionadas. Un objetivo fundamental a perseguir es el balance entre la preservación de la antigenicidad y la necesidad de conservar la arquitectura tisular manteniendo las estructuras relevantes estables e insolubles para que no sean barridas durante el procesamiento de las muestras. Una fijación insuficiente llevaría a la eliminación de los antígenos solubles en los procesos de lavado sin dejar opción alguna para unir el anticuerpo. Por otra parte, los fijadores extremadamente fuertes son potentes desnaturalizadores de las proteínas y/o causantes de reacciones cruzadas, con lo cual obtendríamos una

buena conservación de la morfología tisular a costa de la destrucción de muchos determinantes antigénicos. **(257)*.

No solo es importante el hecho de elegir un fijador adecuado a nuestras necesidades, sino que a veces resulta igual de relevante comprender que una incorrecta manipulación del mismo nos puede llevar a obtener resultados no deseados. De este modo, debemos tener en cuenta que la penetración del fijador en el tejido es un proceso variable que depende de las características del tejido y del tiempo de actuación del fijador. Para asegurar una profundidad de fijación correcta la pieza a fijar debe ser pequeña. Una inadecuada fijación en este sentido puede dejar áreas inaccesibles en el tejido que resultarán en artefactos. Otro factor que puede alterar la fijación es la temperatura a la cual se lleve a cabo. Usualmente, la fijación de muestras con agentes químicos se realiza a temperatura ambiente. Una fijación a 4°C enlentecería la autólisis del tejido y la difusión de sus componentes celulares, sin embargo también frenaría la difusión y acción del fijador. **(257)*.

En los estudios inmunohistoquímicos revisados no solo se ha encontrado la utilización de fijadores químicos **(90,149,153,157,196,201,204,206,208,209,236,239,259)* (generalmente formol). A veces, la aplicación de métodos de fijación físicos mediante congelación sustituye a los primeros. **(201,207,237,260)*. Posiblemente la congelación como método de fijación ofrezca una buena conservación en la composición antigénica de los tejidos y aventaje así a otros procedimientos que puedan producir un enmascaramiento en este aspecto. A cambio la congelación requiere un alto grado de destreza técnica y la morfología tisular que se obtiene no es tan buena como la de las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. **(257)*.

De esta forma *Ciocca DR.* y su grupo llevan a cabo como parte de su trabajo un estudio inmunohistoquímico comparativo sobre cortes obtenidos de biopsias hepáticas fijadas en formaldehído y embebidas en parafina a la vez que sobre secciones adquiridas tras la congelación de las mismas biopsias. Ambos métodos dan resultados similares. Sin embargo, los autores de tal estudio prefieren el primer protocolo mediante el cual los detalles estructurales de los tejidos fueron de mejor calidad. Además, la imbibición de las muestras en parafina ofrece la homogeneidad y dureza necesarias para una obtención y manipulación sencilla de secciones seriadas, finas y de calidad con el fin de evaluar en ellas diferentes inmunoreactividades. **(196).*

Previamente a la imbibición de los tejidos en parafina y como parte del proceso de inclusión es necesario llevar a cabo una deshidratación correcta de la muestra mediante su inmersión en sucesivos baños de alcoholes de grado creciente que extraigan el agua de los espacios intra- y extracelulares con el fin de obtener una ocupación completa de estos mediante la consecutiva impregnación de las muestras en parafina. El proceso de deshidratación en alcoholes completará de algún modo la fijación de las muestras pequeñas aunque no las grandes debido a la lenta velocidad de penetración de los alcoholes. Por otra parte, una deshidratación brusca provocará la retracción del tejido alterando la imagen histológica final. Además, el tiempo de deshidratación así como el volumen de los baños deberán ser elegidos en función del volumen y contenido en agua de la muestra. El empleo de agentes deshidratantes que no son miscibles con la parafina hace necesaria la utilización de líquidos intermediarios en el proceso de aclaramiento o desalcoholización del tejido que se elegirán en función de su rapidez y facilidad para eliminar el deshidratante de la muestra así como por su toxicidad. **(257).* En este sentido, el agente aclarante elegido para nuestro trabajo

(Ultraclear) reemplaza al tradicional xileno retirado por su elevado grado de toxicidad.

Los mismos factores se deberán tener en cuenta a la hora llevar a cabo el proceso inverso de aclaramiento e hidratación de los cortes en la fase de desparafinación previa a la aplicación de la técnica de tinción rutinaria o inmunohistoquímica que corresponda. ^{*(257)}.

A la hora de elegir un medio de inclusión adecuado cabría pensar que es importante tener en cuenta algunas características como su punto de fusión. El punto de fusión de las ceras que habitualmente se emplean en la imbibición de tejidos suele ser de aproximadamente 55°C y muchas proteínas se desnaturalizan a esta temperatura. Sin embargo, el calor justifica poco el enmascaramiento de algunos determinantes antigénicos y no hace a las parafinas responsables de que algunos anticuerpos no actúen satisfactoriamente en el marcaje de los antígenos correspondientes. Hay que saber que los determinantes antigénicos que queden enmascarados de algún modo pueden ser revelados por el tratamiento de los cortes con calor en microondas, ollas o autoclaves. ^{*(257)}.

Sin embargo, es importante tener en cuenta en cualquier estudio inmunohistoquímico que el reconocimiento del antígeno proteico a examinar mediante la utilización de anticuerpos es fuertemente dependiente de la complementariedad estérica y específica existente en la unión antígeno-anticuerpo. Esta observación es de gran importancia práctica si consideramos que en general cualquier agente químico (fijadores, deshidratantes, medios de inclusión, aclarantes,...) o físico (pH, tiempo, volumen,...) que intervenga en el procesamiento de la muestra puede llevar a un enmascaramiento o

desnaturalización con la consiguiente pérdida de la conformación del antígeno a estudiar. Si además, tenemos en cuenta que muchos anticuerpos para la forma nativa de una proteína no reaccionan con formas desnaturalizadas de la misma debido al impedimento estérico mencionado los resultados que obtendríamos si pasáramos por alto la valoración de estos factores quedarían muy lejos de lo que cabría esperar. *(257).

Introduciéndonos en lo que se refiere a la aplicación de la técnica inmunohistoquímica propiamente dicha quizás uno de los puntos más importantes a tener en cuenta sea la elección de un anticuerpo adecuado a los fines que pretendemos. Hoy en día, características como la especificidad y afinidad de los anticuerpos a emplear pueden seleccionarse de acuerdo con las necesidades particulares de cada estudio.

Sin duda, el desarrollo de una técnica para la producción de anticuerpos monoclonales por *Köhler y Milstein* (1975) a través de la construcción de hibridomas fabricantes de anticuerpos de especificidad predefinida justificó el Premio Nobel en Fisiología y Medicina que recibieron en 1984. La aplicación de anticuerpos monoclonales como marcadores inmunohistoquímicos ha tenido un impacto revolucionario en el diagnóstico morfológico en general y en el de la patología neoplásica en particular. El disponer de anticuerpos monoclonales específicos ha facilitado notablemente la identificación de productos celulares o de marcadores superficiales. Frente a los anticuerpos policlonales, los monoclonales dirigidos contra un único epítipo antigénico nos permiten hoy en día detectar y diferenciar muy diversas proteínas tisulares con una gran especificidad aunque a veces sus secuencias de aminoácidos muestren una elevada homología. Quizás, esta última característica haga a los anticuerpos

monoclonales los candidatos más adecuados en el estudio de las numerosas proteínas de choque térmico altamente conservadas a lo largo de las especies y hasta ahora identificadas. Sin embargo, cabría pensar que el hecho de estudiar proteínas con secuencias de aminoácidos muy similares entre diferentes especies pudiera suponer una dificultad a la hora de inmunizar a los animales (ratones) en el protocolo de producción de los anticuerpos. Las proteínas con secuencias altamente conservadas tienden a ser menos inmunogénicas o dicho en otras palabras, es más fácil obtener respuestas inmunológicas fuertes cuando el inmunógeno difiere estructuralmente de los componentes del organismo a inmunizar. Pero el uso en muchos casos de adjuvantes inmunológicos como el de *Freunds's* puede ocasionar la potenciación de una respuesta inmunológica. *(261).

Las proteínas de choque térmico analizadas en este trabajo (*HSP 70* y *HSP 27*) fueron detectadas mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales como ya ha quedado reflejado en ocasiones anteriores. En el protocolo de detección del antígeno *HSP 70* se empleó un anticuerpo monoclonal con especificidad por las 2 formas de la proteína (*HSP73/costitutiva* y *HSP72/inducible*). Sin embargo, la amplia variedad de anticuerpos monoclonales que hoy día ofrece el mercado ha permitido en ocasiones detectar una sola de tales formas de manera diferenciada. Así, el anticuerpo monoclonal y comercial *C92* reconoce exclusivamente la forma inducible. *(152). La capacidad de los anticuerpos monoclonales para anclar solamente un determinante antigénico identificativo de una proteína concreta supone una ventaja considerable frente a los anticuerpos policlonales incapaces de discriminar determinantes antigénicos diferentes dentro de una misma molécula. En consecuencia, la especificidad de los últimos es generalmente menor a la vez que el riesgo de producir reacciones cruzadas inespecíficas puede

verse incrementado. Sin embargo, es necesario tener en cuenta a la hora de trabajar con anticuerpos monoclonales que estos no quedan en absoluto exentos de originar reacciones cruzadas frente a antígenos relacionados estructuralmente con el antígeno problema. La posible aparición de reacciones cruzadas entre antígenos y anticuerpos puede conducir al desarrollo de falsos positivos que repercutirán sin duda en la valoración e interpretación final de los resultados. Las reacciones de este tipo suponen una limitación para los anticuerpos monoclonales. **(261)*.

Ante la posibilidad de desnaturalizarse ciertos antígenos en el procesamiento de las muestras, sobretodo debido a la utilización de fijadores no apropiados o de manera inadecuada, los sueros policlonales aventajan a los monoclonales. Los primeros sueros contendrían anticuerpos individuales capaces de reconocer diferentes epítomos del antígeno problema estén o no desnaturalizados. Sin embargo la situación para los anticuerpos monoclonales no es así. Algunos anticuerpos monoclonales reconocen solo la proteína antigénica nativa, mientras que otros reaccionan con la desnaturalizada. Los anticuerpos monoclonales que reaccionan con el anticuerpo desnaturalizado son particularmente útiles en inmunohistoquímica, sin embargo no todas las formas de desnaturalización conducen a la misma estructura final. Así, la eficacia que se obtenga en la utilización de un anticuerpo monoclonal junto a un determinado proceso de fijación debe ser determinada. Una manera racional de proceder ante la elección de un anticuerpo monoclonal adecuado podría radicar en la utilización de anticuerpos producidos por inmunización con antígenos tratados en el mismo fijador empleado para el procesamiento básico de los tejidos a analizar. Si las muestras a analizar están fijadas en formol emplearíamos un anticuerpo monoclonal obtenido a partir de inmunizaciones con el antígeno que buscamos

tratado con formol. Sin embargo, una estrategia más común se basa en probar una variedad de diferentes anticuerpos monoclonales con el fin de encontrar uno que funcione correctamente en tejidos tratados con el fijador que empleemos habitualmente o experimentar con diferentes procedimientos de fijación de los tejidos con el fin de encontrar un punto intermedio entre la morfología tisular y su antigenicidad. Hoy en día se dispone en el mercado de muchos anticuerpos monoclonales que trabajan de una manera óptima en secciones fijadas en formol y embebidas en parafina. ^{*(257)}.

Es importante tener en cuenta las condiciones físicas ante las cuales llevamos a cabo la aplicación de un anticuerpo. Un factor a considerar son los tiempos de incubación de los anticuerpos dependientes a su vez de la cinética de unión de los anticuerpos a sus antígenos. Resulta imprescindible mantener los tiempos de incubación constantes de un experimento a otro, ya que pasar por alto este punto puede tener como consecuencia errores en la interpretación de los resultados. Parece claro que la cinética de asociación de antígenos y anticuerpos está limitada por algo más que por simple difusión. La formación y disyunción de complejos antígeno-anticuerpo está claramente sujeta a cambios en la temperatura, pH, adición de desnaturalizadores, etc. Es posible tener una interacción antígeno-anticuerpo de alta afinidad aunque podría romperse fácilmente ante un mínimo cambio en las condiciones físicas del medio de reacción. ^{*(262)}.

Muchas de las ventajas que ofrecen los anticuerpos monoclonales frente a los policlonales derivan de su sistema de producción. Ahora, es posible obtener anticuerpos monoclonales exquisitamente específicos y de gran pureza sin requerir para ello el uso de antígenos altamente purificados en la inmunización.

Por otra parte, los cultivos permanentes permiten proporcionar el anticuerpo en cantidades ilimitadas. Además, la homogeneidad que muestran los anticuerpos monoclonales hace que a diferencia de los policlonales no varíen con cada inmunización o sangría realizada al animal. ^{*(261)}.

Aunque no suele ser lo habitual en algunas ocasiones el empleo de anticuerpos comerciales es sustituido por la propia producción y caracterización de los antisueros por parte del mismo laboratorio que los requiere. *Omar R.* y sus colaboradores llevan a cabo un trabajo de detección de la proteína de choque térmico *HSP 70* en biopsias hepáticas. En la parte experimental de este estudio ponen en marcha el desarrollo de un anticuerpo policlonal por tecnología convencional y dirigido hacia la detección de la proteína de choque térmico en cuestión. ^{*(90)}. Sin embargo, la aplicación de una tecnología de este tipo supone la obtención de un inmunógeno, preparación del adyuvante a emplear como potenciador de la respuesta inmune, inmunización de los animales, generación de hibridomas, selección del clon deseado en el caso de la producción de anticuerpos monoclonales, crecimiento en cultivos o animales, purificación de los anticuerpos, caracterización adecuada de la especificidad del nuevo anticuerpo producido y todo ello junto con la aplicación de las técnicas correspondientes y a veces bastante laboriosas que conlleva la ejecución de todos estos pasos como son técnicas de radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, *ELISA*, cromatografía de afinidad, análisis Western Blots, etc. La gran comodidad, calidad y oferta que hoy en día muestra el mercado en cuanto a anticuerpos comerciales nos permite salvar las dificultades que se nos puedan plantear a la hora de elaborar los anticuerpos con nuestros propios medios. ^{*(261)}.

No solo la elección de un anticuerpo es importante a la hora de poner en marcha una técnica. La elección de un sistema adecuado para la detección de antígenos puede llegar a ser igual de esencial. El análisis inmunohistoquímico de tinción para la demostración de las proteínas a estudiar en este trabajo se llevó a cabo por la Técnica Streptavidina-Fosfatasa Alcalina (un método indirecto en 3 pasos).

Existen múltiples variantes en cuanto a los posibles sistemas de detección que se pueden aplicar a la hora de realizar un estudio inmunohistoquímico. Sin embargo, básicamente se pueden reunir en 2 grupos. Son:

- **MÉTODOS DIRECTOS:** Se trata de la variante más sencilla. Consiste en la aplicación directa sobre el tejido de un anticuerpo marcado dirigido contra el antígeno que se pretende localizar. **(257)*.

- **MÉTODOS INDIRECTOS:** En este caso se aplican sobre la muestra 2 anticuerpos: a) un anticuerpo primario no marcado y específico del antígeno que se pretende localizar; b) un segundo anti-anticuerpo marcado dirigido contra el primero y desarrollado en una especie animal diferente a la empleada en la producción del anticuerpo primario. Dentro de los métodos indirectos también se incluyen aquellos que, en el caso de que el anticuerpo secundario no esté conjugado con ningún marcador, emplean un anticuerpo terciario dirigido contra el secundario y desarrollado en la misma especie animal destinada a la obtención del primero. En este último caso el anticuerpo terciario estaría marcado. **(257)*.

La elección de un método u otro debe realizarse tras la previa estimación de las ventajas que nos pueda aportar un sistema respecto al otro. La aplicación de un

método inmunohistoquímico directo puede resultar ser una técnica más rápida en su ejecución al requerir una única incubación, la llevada a cabo con el anticuerpo marcado y específico del antígeno que buscamos. Al mismo tiempo, el hecho de emplear anticuerpos primarios marcados sin necesidad de realizar incubaciones con otros anticuerpos reduce la posibilidad de que se establezcan uniones inespecíficas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la utilización de anticuerpos primarios conjugados con marcadores puede ser un hecho arriesgado. La manipulación necesaria para marcar la molécula de inmunoglobulina puede conducir a la alteración de la misma y por lo tanto a la pérdida de su especificidad. Además, cuando apliquemos métodos directos necesitaremos tantos anticuerpos diferentes marcados como antígenos queramos demostrar.

*(257).

El desarrollo de los métodos inmunohistoquímicos indirectos aventaja a los directos en cuanto a que no requieren el marcaje de anticuerpos primarios evitando así alteraciones en su especificidad. Las técnicas indirectas permiten además emplear los mismos anticuerpos secundarios y terciarios (sistemas de detección) para la demostración de diferentes antígenos siempre y cuando sean compatibles con la subclase de inmunoglobulina empleada como anticuerpo primario. Estos sistemas ofrecen grandes incrementos en la sensibilidad debido a que cada anticuerpo primario podrá unir varios secundarios. Si se añade un anticuerpo terciario al desarrollo de la técnica la sensibilidad aumentaría aún más. Sin embargo, los aumentos excesivos en la sensibilidad pueden conducir a un incremento en el riesgo de aparición de uniones inespecíficas y tinciones de fondo. Tras la valoración de ambos métodos inmunohistoquímicos, directos e indirectos, los segundos podrán resultar más laboriosos pero sus ventajas justifican el hecho de ser habitualmente los elegidos a la hora de trabajar. *(257).

Un hecho común e imprescindible en cualquier método inmunohistoquímico que se aplique, independientemente del número de pasos o incubaciones que realicemos, es que siempre se requerirá un marcador acoplado al final de la cadena de anticuerpos que conforma nuestro sistema y que nos permita de algún modo visualizar la reacción antígeno-anticuerpo que buscamos. Los marcadores que se vienen aplicando más frecuentemente son enzimas aunque la utilización de otros marcadores como fluorocromos o sustancias radioactivas no ha quedado en absoluto descartada. Sin embargo, el hecho de que los anticuerpos acoplados a marcadores fluorescentes no permitan visualizar la reacción antígeno-anticuerpo a la vez que la arquitectura del tejido ha provocado un mayor impulso en el empleo de anticuerpos marcados enzimáticamente. ^{*(263)}.

Las enzimas principalmente empleadas en estudios inmunohistoquímicos son la peroxidasa (extraída del rábano) y la fosfatasa alcalina (aislada del epitelio del intestino de ternera). En nuestro trabajo nos inclinamos por la utilización de la fosfatasa alcalina. Sin embargo, la base funcional de ambas enzimas es la misma. Se trata de la adición de un substrato por el que la enzima tenga especificidad y sea capaz de transformar en un producto. Este último consiste en un precipitado insoluble que al reaccionar frente a un cromógeno añadido nos proporcionará un segundo producto coloreado que nos permite visualizar la reacción. ^{*(263)}. (FIGURA 1).

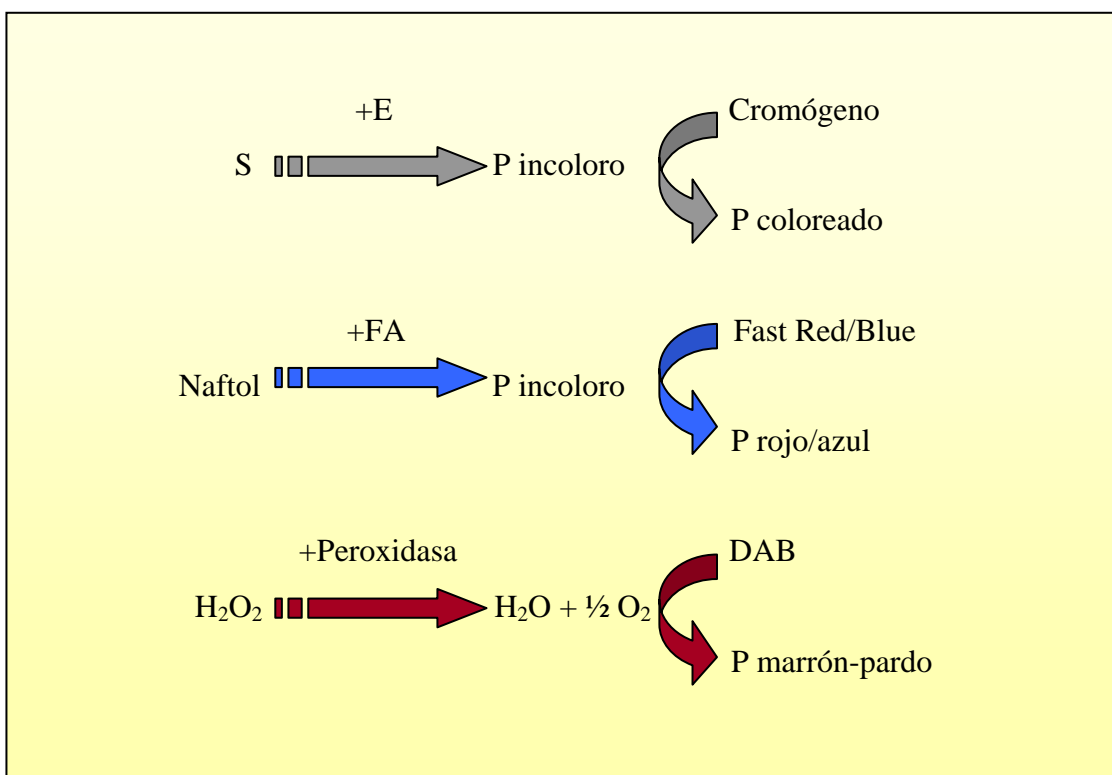
La fosfatasa alcalina hidroliza ésteres de fosfato en un medio alcalino. En este caso se emplea naftol-AS-fosfato como substrato para la enzima y sales de diazonio tipo fast red *TR* o fast blue *BB* como agentes cromógenos. El resultado es un producto coloreado rojo o azul, dependiendo del cromógeno empleado, pero siempre fácilmente detectable y distinguible entre las estructuras tisulares.

(FIGURA 1). La mayor ventaja que nos ofrece la fosfatasa alcalina es que debido a la escasa proporción de tejidos que en condiciones normales contienen la enzima (células del epitelio intestinal y algunos linfocitos *B*) no suele ser necesario inhibir su actividad endógena. Aunque en el caso de ser requerido la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina endógena podrá ser completamente abolida mediante el tratamiento de los tejidos con determinados agentes como el levamisol. Por otro lado, el principal inconveniente de los métodos que utilizan la fosfatasa alcalina como trazador es la necesidad de usar un medio de montaje acuoso y no permanente para la confección definitiva de las preparaciones debido a la solubilidad de los productos de la reacción en alcoholes y solventes orgánicos empleados normalmente en medios de montaje permanentes. La utilización de un medio de montaje acuoso compite en desventaja con los medios permanentes debido a su gran tendencia a secarse y su consiguiente crecimiento microbiano. Además, no ofrece las propiedades ópticas óptimas cuando se emplean objetivos de elevado poder de resolución. ^{*(263)}.

A diferencia de la fosfatasa alcalina la peroxidasa endógena está presente de una forma mucho más extensa en la mayoría de las células, como las derivadas del linaje mieloide, haciéndose casi imprescindible su bloqueo en la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas. Asimismo, la peroxidasa endógena es una enzima bastante resistente y difícil de desactivar. Su bloqueo implica generalmente el uso de agentes fuertemente oxidantes como el peróxido de hidrógeno pudiendo causar la destrucción de los determinantes antigénicos deseados. Por otra parte, las técnicas que emplean como enzima marcadora la peroxidasa utilizan diaminobencidina (*DAB*) como cromógeno, un compuesto considerado como altamente cancerígeno que debería manejarse con sumo cuidado y que al oxidarse origina un producto insoluble de color marrón-pardo, un color mucho

más manifiesto en la naturaleza tisular que puede llegar a confundirse entre algunas estructuras. (FIGURA 1). A veces y en sustitución de la *DAB* se emplea 3-amino-9-etilcarbazol (*AEC*) una nueva enzima que da un producto de reacción rojizo. *(263).

FIGURA 1:



Reacciones catalizadas por las enzimas más comúnmente empleadas como marcadores en inmunohistoquímica. *E*: Enzima; *S*: Sustrato; *P*: Producto; *FA*: Fosfatasa alcalina; *DAB*: Diaminobencidina.

De entre los diversos artículos revisados podemos observar que la utilización de la enzima peroxidasa como marcador en trabajos inmunohistoquímicos está ampliamente extendida *(90,157,201,204,206,207,237,264) quedando algo más restringido el

empleo de la fosfatasa alcalina a pesar de sus provechosas cualidades anteriormente discutidas. *(152,156,239).

Hoy en día las técnicas inmunohistoquímicas nos ofrecen un amplio abanico de posibilidades a la hora de elegir un sistema adecuado a nuestras pretensiones. La posibilidad de introducir más o menos pasos diferentes en la cascada de incubaciones dentro de los métodos inmunohistoquímicos indirectos, la combinación de una amplia variedad de anticuerpos distintos y todo ello junto al hecho de poder escoger entre más de una enzima marcadora ha repercutido en la aparición de múltiples sistemas inmunohistoquímicos de detección. Algunos de los métodos más comúnmente empleados son: Sistema de Detección Peroxidasa Anti-Peroxidasa (*PAP*), Fosfatasa Alcalina Anti-Fosfatasa Alcalina (*APAAP*), Método Complejo Avidina-Biotina (*ABC*) y Sistema Streptavidina-Fosfatasa Alcalina. En los cuatro casos se trata de métodos indirectos, sin embargo los dos últimos presentan una peculiaridad que ha supuesto sin duda una poderosa ventaja frente al resto de los sistemas de detección existentes hasta ahora. Se trata de la introducción en los sistemas multicapa de dos moléculas que han sido utilizadas ampliamente en biología: la avidina (o streptavidina) y la biotina. Así, basándose en la gran afinidad que poseen entre sí ambas moléculas capaces de formar un fuerte enlace irreversible y no inmune se han elaborado métodos inmunohistoquímicos de excelente efectividad. *(265).

La avidina es una glicoproteína extraída de la clara de huevo, mientras que la streptavidina se obtiene a partir de la bacteria *Streptomyces avidinii*. A pesar de sus diferencias en cuanto al origen ambas moléculas presentan estructuras tetraméricas. Se trata de cuatro subunidades que conforman una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión a la biotina. Sin embargo, el

uso de la streptavidina ha sido difundido de una forma mucho más extensa que el de la avidina. La streptavidina muestra un punto isoeléctrico mucho más cercano a la neutralidad que la avidina y como consecuencia disminuye la probabilidad de uniones inespecíficas. Por el contrario, la naturaleza extremadamente básica de la molécula de avidina puede causar su unión electrostática a estructuras ácidas como el *ADN* y de este modo potenciar la aparición de uniones inespecíficas. *(266).

Por otra parte, la biotina es una vitamina de la yema de huevo capaz de conjugarse fácilmente con anticuerpos y enzimas trazadoras a través de enlaces covalentes. *(266).

Cuando estas moléculas (streptavidina y biotina) se introducen en los sistemas de detección de antígenos tisulares nos encontramos con que la sensibilidad del sistema aumenta considerablemente frente a otros métodos que no aprovechan las propiedades ventajosas de tales moléculas. *(266).

Dentro de todos los métodos de detección existentes nos interesa profundizar en el seleccionado para la realización de este trabajo: LA TÉCNICA STREPTAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA. Se trata de un método indirecto llevado a cabo en tres pasos. El primer paso como en cualquier otra técnica inmunohistoquímica se remite a la aplicación del anticuerpo primario dirigido hacia el antígeno que deseamos poner en evidencia. Es importante aplicar el anticuerpo primario en unas condiciones adecuadas. Por ello un anticuerpo que se aplique por primera vez debe ser debidamente testado. El anticuerpo será probado a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Las condiciones de incubación óptimas serán aquellas que nos ofrezcan la máxima intensidad de

marcaje con la mínima tinción de fondo. Concentraciones excesivamente altas y tiempos de incubación demasiado largos provocan la aparición de un marcaje inespecífico además de no resultar ser un procedimiento económico. Por el contrario, concentraciones bajas y tiempos de incubación cortos podrían resultar en intensidades de marcaje insuficientes. Además, se tendrá en cuenta que la temperatura de incubación influye de un modo directo sobre la reacción de reconocimiento entre antígenos y anticuerpos. Generalmente, los anticuerpos se incuban a temperatura ambiente. Sin embargo, los tiempos de incubación deben disminuirse cuando se aplican a temperaturas altas y viceversa. ^{*(257)}.

El segundo paso de la Técnica Streptavidina-Fosfatasa Alcalina consiste en la aplicación de un anticuerpo secundario o puente. En nuestro caso se trata de una anti-inmunoglobulina anti-ratón IgG biotinada. El anticuerpo secundario debe cumplir 2 características esenciales. Por una parte, será un anticuerpo originado en una especie animal diferente a la empleada en la obtención del anticuerpo primario y además ambos anticuerpos (primario y secundario) deben corresponder a la misma clase de inmunoglobulina. Asimismo, para la puesta en marcha de nuestro sistema de detección el anticuerpo secundario es modificado en su región *Fc* (constante) sin efectos adversos para su afinidad de unión mediante la adhesión de moléculas de biotina. ^{*(257)}.

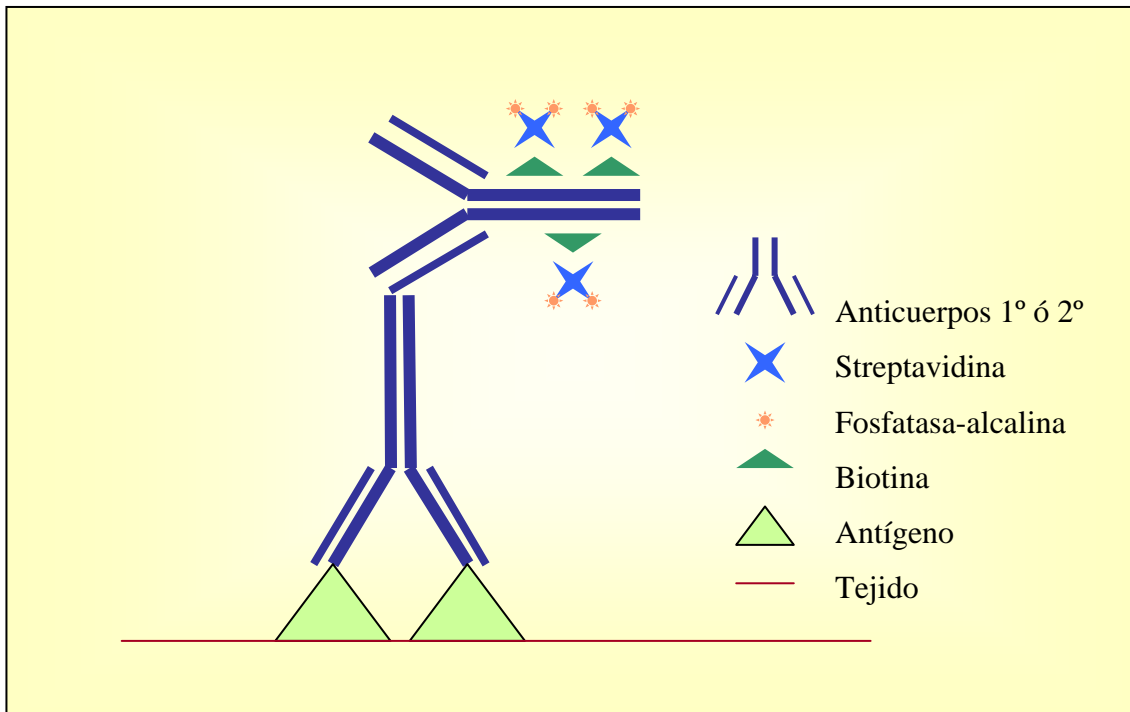
Siguiendo con el proceso y en una tercera incubación se lleva a cabo la aplicación de la enzima trazadora que nos permita poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo. En verdad, se lleva a cabo la aplicación de un complejo Streptavidina-Fosfatasa alcalina. La conjugación de la streptavidina a la enzima fosfatasa alcalina permite que el complejo se una de una manera altamente afín e irreversible a la biotina conjugada al anticuerpo puente previamente incubado. Es

en esta unión esencial entre Streptavidina y biotina donde reside la propiedad más ventajosa que nos ofrece la Técnica Streptavidina-Fosfatasa Alcalina. El hecho de que la streptavidina posea cuatro regiones de unión a la biotina facilita el acoplamiento entre ambas moléculas y por lo tanto el acercamiento entre la fosfatasa alcalina y el suero secundario. Además, la conjugación de la streptavidina con la enzima tiende a ser optimizada por los laboratorios fabricantes de tales conjugados para obtener la unión del máximo número de moléculas de streptavidina a la enzima marcadora. El efecto es conseguir importantes aumentos de la señal generada a partir de la unión antígeno-anticuerpo. **(266)*.

La adición por último de un substrato para la enzima empleada junto a un cromógeno adecuado nos permite visualizar la reacción que nos interesa mediante la formación de un precipitado coloreado. **(257)*.

Un esquema nos ayudará a comprender mejor la base funcional del Sistema Streptavidina-Fosfatasa Alcalina. (*FIGURA 2*).

FIGURA 2:



Esquema sobre la base funcional del Sistema de Detección Streptavidina-Fosfatasa Alcalina.

Es importante tener en cuenta para obtener unos resultados satisfactorios la realización de lavados en tampones que serán siempre posteriores a la incubación de cada uno de los sueros que formen parte de la técnica puesta en marcha. Los lavados tienen como fin la eliminación del exceso de suero no reaccionante que halla podido quedar en los cortes y que de otra manera podrían dar lugar a la aparición de falsos positivos. Por otro lado, los lavados excesivos pueden también de algún modo aunque infrecuentemente dificultar la técnica. Despegar los cortes y romper uniones específicas arrastrando los componentes de las mismas son algunas de las consecuencias posibles que puede conllevar la realización de lavados descomedidos. *(257).

Uno de los pasos quizás más críticos a la hora de desarrollar una técnica inmunohistoquímica es el revelado, entendiendo como tal la aplicación sobre los cortes de un sustrato para la enzima marcadora junto a un cromógeno que nos permita visualizar mediante un cambio de color la presencia del antígeno problema. El tiempo de incubación del sustrato + cromógeno, en nuestro caso Naftol + Fast red, nunca puede ser predeterminado sino que variará de una ocasión a otra en función de la velocidad de desarrollo del color. Por lo tanto, el tiempo deberá juzgarse mediante la apariencia macroscópica del portaobjetos o mejor bajo control microscópico mientras el sustrato y cromógeno están actuando. De este modo, la reacción podrá ser frenada en agua destilada en el momento en que consideremos que el color sea correcto, teniendo en cuenta que los tiempos de revelado excesivamente largos pueden conducir a la aparición de tinciones de fondo indeseables mientras que los revelados demasiado cortos pueden generar falsos negativos ante la falta de tiempo para que se produzca la reacción de color. ^{*(257)}.

Contrastar los núcleos con hematoxilina como último paso de la técnica permitirá una mejor visualización de la estructura del tejido. En ocasiones otras coloraciones de contraste como el verde metileno son aplicadas. ^{*(257)}.

Hoy en día la existencia en el mercado de diferentes kits comerciales para la detección de reacciones antígeno-anticuerpo a simplificado considerablemente las técnicas. De este modo, mediante el empleo actualmente de un único kit MultiLink podemos detectar una amplia batería de anticuerpos primarios de diversas especies, además de ser útiles tanto para anticuerpos monoclonales como policlonales. Se trata de sistemas de elevada sensibilidad que ofrecen marcajes más intensos, reducen la necesidad de agentes bloqueantes y

pretratamientos, y requieren reducidos tiempos de incubación así como bajas concentraciones de anticuerpos primarios. *(257).

Con el fin de restablecer la antigenicidad que pudo quedar oculta en el proceso de fijación de las muestras con formol en nuestro caso optamos por someter los cortes a un pretratamiento térmico en microondas antes de llevar a cabo la incubación con el suero primario. La aplicación o no de un pretratamiento en el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas así como cual de los diversos modos de pretratamiento descritos hasta el momento es el más conveniente para los fines que pretendemos han sido desde el principio puntos de controversia. La aplicación de digestiones enzimáticas y tratamientos térmicos son las opciones preferidas. Sin embargo, la elección entre una enzima u otra como pretratamiento digestivo o entre la olla a presión o el microondas como métodos térmicos es aún discutido. *(257).

Las digestiones enzimáticas con proteasas resultan útiles en tejidos fijados en formalina y parecen ser capaces de reducir en principio la tinción de fondo inespecífica. Sin embargo, la digestión del antígeno puede debilitar el marcaje o crear falsos negativos. Asimismo, la digestión proteolítica excesiva de antígenos tisulares puede desenmascarar fragmentos proteicos comunes a distintos antígenos y aumentar así la tinción no específica. Además, una digestión excesiva puede llegar a provocar la destrucción del tejido con desprendimiento de porciones del mismo. No existe una proteasa universal que sea adecuada para todo tipo de antígenos pero en general se obtienen buenos resultados con tripsina.

*(258).

Como ha quedado reflejado al inicio de la discusión sobre los materiales y métodos empleados el formol, considerado como el fijador universal, conserva los tejidos mediante un mecanismo de reticularización a través de la formación de puentes cruzados de tipo metileno. Estos enlaces resultan ser sensibles al calor rompiéndose con el mismo. Este es uno de los motivos que incitan a trabajar utilizando métodos de recuperación antigénica basados en el suministro de calor. Las fuentes de calor descritas son diversas. Microondas, olla a presión, autoclave y estufa son algunas de ellas. La decantación por un aparato u otro es un hecho polémico. Sin embargo, cualquier fuente de calor debería ser eficaz mientras halla sido adecuadamente optimizada. En principio la máquina inductora de calor no debe ser importante siempre y cuando sean considerados y ajustados algunos factores como el tiempo, la temperatura, el tipo de solución, su pH y la molaridad. Los factores tiempo y temperatura deben adquirir como siempre una relación inversa. Temperaturas elevadas deben combinarse con tiempos cortos y viceversa. Así, pretratamientos excesivos en el tiempo suponen arriesgarse a una destrucción y desprendimiento del tejido o un desenmascaramiento de antígenos no deseados. Del mismo modo, tiempos demasiado escasos conllevarán un desenmascaramiento antigénico posiblemente ineficiente. ^{*(257)}.

En nuestro trabajo y siguiendo las recomendaciones de *Shi SR.* y su equipo optamos por la aplicación de un pretratamiento térmico mediante microondas resultando ser un método para el desenmascaramiento antigénico rápido, cómodo y eficaz. El tiempo de exposición de las muestras en el microondas fue previamente optimizado teniendo en cuenta entre otros factores la potencia del aparato. Asimismo, elegimos como medio para el desenmascaramiento buffer citrato a un *pH 6* y *IM* empleado de manera rutinaria en estos fines. ^{*(267)}.

Aunque no sea este el caso, la automatización actual de las técnicas inmunohistoquímicas ha supuesto una importante ayuda en aquellos laboratorios que se caracterizan por poseer grandes volúmenes de trabajo. La automatización abarca desde el procesamiento inicial de las muestras mediante la puesta en marcha de máquinas (*Autotechnicon* y *VIP*) capaces de llevar a cabo la deshidratación, aclaramiento e inclusión de los tejidos en parafina, hasta las nuevas máquinas empleadas en la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas propiamente dichas. Sin embargo, en nuestro estudio hemos optado por una aplicación a mano de todas las técnicas permitiéndonos de este modo llevar a cabo un seguimiento más eficiente del proceso. *(257).

La automatización de las técnicas inmunohistoquímicas ha supuesto la aparición de diversos tipos de máquinas como son las de capilaridad y las de difusión. Las primeras implican el enfrentamiento de cristales con el fin de que los diferentes reactivos asciendan por capilaridad entre los mismos. Por el contrario, las máquinas de difusión llevan a cabo la aplicación de los sueros sobre los cortes mediante un mecanismo de dispersión. En ambos tipos de automatización surgen dudas sobre si verdaderamente los mecanismos empleados en la aplicación de los reactivos son eficaces o no. Parece relativamente fácil pensar que si no se toman las medidas adecuadas tanto el ascenso de los sueros por capilaridad como la dispersión de los mismos en máquinas de difusión serán irregulares pudiendo conducir a la obtención de resultados confusos e indeseados. Tampoco parece apropiada la estandarización de los tiempos de incubación llevada a cabo en las máquinas. No todos los anticuerpos requieren iguales tiempos de incubación. Pero sin duda, la mayor desventaja en la automatización de las técnicas inmunohistoquímicas afecta al último paso, el revelado. Los tiempos de revelado varían ampliamente de unas muestras a otras por lo que resulta conveniente

llevar a cabo un control de este paso bajo el microscopio óptico lo cual solo es posible en la aplicación a mano de la técnica. **(257)*.

En toda técnica resulta útil el empleo de controles que nos ayuden a interpretar los resultados de una manera correcta. Tanto la utilización de controles externos como internos resulta válida en la detección de falsos positivos o negativos que puedan aparecer bajo múltiples causas. **(257)*.

La vimentina, un antígeno presente en la mayoría de los tejidos y sensible al procesamiento de los mismos, es frecuentemente elegida como control interno positivo para identificar falsos negativos en tejidos sobrefijados indicando de este modo cuando un pretratamiento adicional puede ser requerido. En ocasiones, una fijación excesiva de una muestra provoca la aparición de falsos negativos generalmente en la periferia de la misma que se observan como regiones con falta de marcaje y coloración debido a un enmascaramiento antigénico al que no se le ha puesto remedio alguno. No solo alteraciones en la fijación pueden llevar a la aparición de falsos negativos, la desnaturalización del antígeno por acción del calor también puede ser la causa. **(257)*.

Sin embargo, muchos equipos optan por llevar a cabo un control interno negativo en cortes adyacentes al original mediante la omisión del anticuerpo primario y su sustitución por un anticuerpo del mismo isotipo pero de irrelevante especificidad. **(198,206,208,209,237)*.

Otra posibilidad sería la aplicación de controles positivos externos siempre a partir de tejidos de los cuales se conoce con certeza que contienen el antígeno a estudiar. **(257)*.

Por su parte, algunos equipos como el de *Kato S.* y sus colaboradores llevan a cabo un análisis de la expresión de algunas proteínas de estrés en tumores cerebrales humanos. En tal estudio incorporan muestras de tejidos cerebrales normales como controles negativos externos. **(204)*.

Tan importante como una correcta aplicación de los métodos experimentales resulta una adecuada valoración de los resultados.

A veces, las evaluaciones son incompletas y no son considerados todos los detalles que nos puede ofrecer una técnica inmunohistoquímica. Algunos trabajos solo consideran a la hora de evaluar los resultados la intensidad del inmunomarcaje sin detenerse a determinar el promedio de células positivas encontrado para cada muestra. **(209)*. Los casos a la inversa son también observados con frecuencia. **(197)*.

Por otra parte, los resultados obtenidos están sujetos a las pautas de valoración de cada investigador. Por ejemplo, cuando la intensidad del marcaje es altamente variable dentro de una muestra dada tal fluctuación no siempre es considerada. Muchas veces y en esta situación se estima solo la intensidad de las células más fuertemente positivas suponiendo tal hecho el descuido de datos que en ocasiones pueden tener un cierto peso en las conclusiones finales. **(152)*.

Sin duda, se trata de pequeñas modificaciones subjetivas pero que pueden desembocar en ciertos errores de interpretación.

4.2.-CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE HSP 27 Y HSP 70:

Desde las primeras referencias difundidas a cerca de la existencia de las proteínas de choque térmico muchos han sido los esfuerzos realizados por los investigadores con el fin de aportar nuevos datos relativos a las posibles funciones que tales proteínas pudieran desempeñar en muy diversas situaciones patológicas. Así, dichas implicaciones se han buscado y perseguido en desórdenes clínicos que afectan a numerosos órganos y tejidos.

Muchos estudios han analizado la posible participación que las proteínas de estrés pudieran mantener en ciertas enfermedades no oncológicas. La expresión incrementada de algunas *HSP's* en estructuras tisulares patológicamente alteradas en comparación con los sujetos control ha llevado a suponer en ocasiones importantes papeles para tales proteínas en diversas afecciones. Así, diferentes formas de daño pulmonar tales como asma, bronquitis crónica o Síndrome de Dificultad Respiratoria del Adulto (*SDRA*) han mostrado niveles de expresión de *HSP 70* crecidos en el epitelio de las vías aéreas y/o macrófagos alveolares. Tal sobreexpresión proteica ha llevado a sugerir la participación de las proteínas de choque térmico en funciones citoprotectoras. ^{*(159,239,268)}. De un modo similar, la localización incrementada de la proteína de choque térmico de 72kD en enfermedades tiroideas autoinmunes ha hecho plantearse una posible colaboración de las *HSP's* en funciones inmunológicas. ^{*(149)}. En pacientes con enfermedad alcohólica hepática muchos hepatocitos muestran inmunoreactividad positiva para *HSP 70* proponiéndose un involucramiento de la proteína en la patogénesis de la enfermedad. ^{*(90)}.

Sin embargo, muchas de las investigaciones realizadas han ido encaminadas hacia una mejor comprensión de la presencia de las proteínas de estrés en sin duda una de las patologías más importantes de nuestro siglo: *El Cáncer*. Distintos estudios concluyen que las células tumorales difieren de las normales en su patrón de expresión de ciertas *HSP*'s; en comparación con las células normales, las tumorales expresan altos niveles de estas proteínas. Así, cada vez es posible encontrar más tratados que exploren el significado biológico que proteínas como *HSP 70* y *HSP 27* pudieran tener en diferentes procesos neoplásicos. **(150,151)*.

La diferencia de expresión de proteínas de estrés entre células neoplásicas y normales se ha hecho evidente en múltiples ocasiones. Así, desde que la detección de *HSP 27* ha resultado ser muy escasa en el tejido mamario normal y sin embargo se han hallado altos niveles proteicos en las células tumorales correspondientes al mismo tejido se insinúa una ruta biológica para *HSP 27* en el carcinoma de mama. **(197)*. Igualmente *HSP 27* se halla en miometrio normal y leiomioma uterino pero el nivel proteico es significativamente más dominante en las fibras de leiomioma. **(269)*. En hepatomas y en comparación con el hígado normal se ha determinado un incremento en la expresión del gen que codifica para la proteína *HSP 70*. **(155)*. También las células tumorales pertenecientes a carcinomas pulmonares muestran elevados niveles de tal proteína en relación con las células que conforman la arquitectura pulmonar normal. **(152,206,208,209)*. De esta manera conclusiones muy similares han quedado confirmadas en muchas situaciones neoplásicas de orígenes diversos como son tumores de cérvix uterino **(270)*, tumores intracraneales **(201)*, fibrohistiocitomas malignos **(157)* o incluso leucemias linfoblásticas **(271)*.

Como consecuencia de los numerosos estudios que determinan una destacada manifestación de ciertas proteínas de estrés en tumores se nos plantea una pregunta: ¿Qué sentido tiene la sobreexpresión de tales *HSP's* en tejidos neoplásicos?. Pues bien no existe una respuesta firme y decisiva sino que son varias las hipótesis que se barajan. Son muchos los aspectos de sus funciones, regulación y expresión los que podrían explicar el papel que las *HSP's* juegan en cáncer. *(150).

Si consideramos una neoplasia como una masa anormal de tejido con un crecimiento indiscriminado y descontrolado que sobrepasa el de los tejidos normales y no se encuentra coordinado con ellos, pudieran resultar interesantes las investigaciones llevadas a cabo a cerca de una posible participación de las proteínas de choque térmico en el ciclo, proliferación y diferenciación celular.

El hallazgo de altos niveles de expresión del gen *HSP 70* en células tumorales *HeLa* durante la fase *S* o de síntesis del ciclo celular, en la cual tiene lugar la duplicación del *ADN*, ha llevado a plantearse si verdaderamente estas proteínas son necesarias para la división celular y porque no para proliferar. *(97,272). Y es que, en células normales ya quedó descrita la misma expresión proteica de una manera dependiente del ciclo celular. *(273,274).

Sin embargo, no para todos los autores los niveles de *HSP 70* están regulados durante el ciclo celular al menos en células tumorales. En efecto, la escasa inducción de *HSP 70* durante las fases del ciclo celular *S-G2-M* hace dudar en ocasiones sobre su requerimiento para la división. *(151).

Por su parte, varias líneas celulares de cáncer de mama han servido para demostrar *in vitro* la existencia de una positiva y significativa correlación entre la expresión de *HSP 27* junto a términos de crecimiento y proliferación tumoral. *(275).

No obstante, y en contraposición con tales datos, numerosos testimonios confirman más bien la participación que la proteína de bajo peso molecular ejerce en relación con procesos madurativos. Así, la proteína *HSP 27* de macrófagos puede ser un marcador de diferenciación y arresto en fase G1 (fase en la cual permanecen las células hijas resultantes de una mitosis durante un periodo variable en función del tipo de tejido). *(276). Paralelamente, se ha sugerido que los niveles de *HSP 27* podrían estar inversamente correlacionados con oncogenicidad. Empleando células transformadas, *Zantema A.* y sus colaboradores demostraban una relación inversa entre los niveles de expresión de *HSP 27* junto a la inducción del crecimiento tumoral. *(277). Y en numerosas ocasiones, la significativa presencia de la proteína de estrés de bajo peso molecular en una gran variedad de neoplasias bien diferenciadas, en comparación con los mismos tumores de menor diferenciación, ha llevado a considerar a la proteína *HSP 27* como un marcador de maduración. *(157,198,278,279,280).

Y es que, no todos los datos apoyan la participación de las proteínas de choque térmico en procesos de proliferación, sino todo lo contrario. Así, el incremento de *HSP's* en tumores puede tener implicaciones en otros procesos biológicos incluyendo la apoptosis o muerte celular programada (*MCP*).

Los agentes causantes de una neoplasia pueden actuar en 2 vertientes: a) estimulando la proliferación celular; b) inhibiendo la apoptosis. De este modo, la

ruptura en un tejido del equilibrio entre proliferación y *MCP* puede conducir al desarrollo de un tumor. ^{*(281)}.

La apoptosis es un proceso activo que ocurre en respuesta a un incremento del calcio intracelular vía activación de rutas de señalización en las que participan proteínas kinasas. ^{*(282)}. Tal incremento cálcico puede inducir la expresión de algunos genes implicados en ciertos cambios morfológicos en la célula que conducen en último término hacia la muerte celular. *C-myc* es uno de los genes implicados en apoptosis. ^{*(283,284,285)}. Pues bien, la presencia de dos secuencias en la región promotora del gen *HSP 70* capaces de unir el producto oncogénico *c-myc*, conocido por immortalizar células en cultivos, sugiere que este último podría jugar un papel en la expresión de *HSP 70* por interacción directa con su promotor. ^{*(216,218,286)}. El último efecto del oncogen *c-myc* será una activación de la expresión de la proteína de estrés en una situación de inhibición de la *MCP* circunstancia que en ocasiones puede contribuir al desarrollo de una neoplasia.

Las proteínas de estrés también han sido comprometidas en otro patrón de muerte celular como es la necrosis. Algunos estudios concluyen que la expresión de *HSP 70* y/o *HSP 27* puede proteger de la necrosis inducida por el factor de necrosis celular *TNF- α* y *- β* . ^{*(139,287,288,289,290,291)}.

Quizás, una de las implicaciones descritas para *HSP 70* más investigadas sea su capacidad de interacción con los productos oncogénicos correspondientes a genes esenciales para la regulación de la proliferación celular e implicados en algunos cánceres. ^{*(150)}. Las más estudiadas son las uniones llevadas a cabo como acompañante molecular de los productos proteicos del gen supresor de tumores *p53*. ^{*(25,212,213,215)}.

Algunos trabajos llevados a cabo sobre tejidos neoplásicos desarrollan hipótesis que intentan explicar la interacción específica de *HSP 70* con *p53* sugiriendo la posibilidad de que esté relacionada con la actividad transformante de este último.

El gen supresor de tumores *p53* actúa como un regulador negativo del crecimiento celular al interaccionar con ciertos factores de transcripción o incluso regulando directamente la transcripción de determinados genes. ^{*(150)}. De este modo, aquellas alteraciones que afecten al gen en cuestión conducirán sin duda a una pérdida de la regulación negativa del crecimiento dándose una rápida proliferación celular ^{*(26)}. De hecho, mutaciones y/o deleciones en alguno de los alelos del gen *p53* son reconocidas como las más comunes lesiones genéticas halladas en cáncer. ^{*(22)}. Muchas mutaciones de *p53* conducen a una alteración en la conformación molecular que prolonga la vida media de la proteína en comparación con los 20 minutos de vida media observados en el tipo salvaje produciéndose en último término una acumulación anormal de la misma. ^{*(213)}. Además de incrementar la vida media de la proteína *p53*, diferentes mutaciones pueden influir en su capacidad para unirse a la proteína de choque térmico *HSP 70*. La formación de complejos *p53* mutante-*HSP 70* puede ser en parte responsable de la estabilización y acumulación del antígeno *p53* en las células tumorales. ^{*(25,212,213,215)}.

Así, *Koshiyama M.* y su equipo demuestran que *HSP 70* es sobreexpresada en células de carcinoma endometrial positivas para *p53*. Por el contrario, la proteína de estrés no se expresa o lo hace débilmente en aquellos carcinomas negativos para la proteína oncogénica. De este modo, *p53* parece ser fuertemente influenciada por la presencia de la proteína *HSP 70*. ^{*(260)}.

Sin embargo, y en contraposición, algunos autores como *Elledge RM.* y sus colaboradores no apoyan la estabilización de *p53* en respuesta a la formación de complejos *p53* mutante-*HSP 70*. Al menos en cáncer de mama, *HSP 70* no se colocaliza con *p53* y puede que no sea el promotor de su acumulación. **(207)*.

Si una de las características más identificativas de la proteína de choque térmico *HSP 70* es su relación con los productos proteicos de algunos oncogenes, quizás el rasgo más llamativo y distintivo detectado de entre las diferentes propiedades asignadas a la proteína *HSP 27* sea su aparente correlación con la expresión del receptor de estrógenos (*RE*). Así, son muchas las observaciones que han sido llevadas a cabo a lo largo de los años y que apuntan hacia la posible influencia que los estrógenos puedan ejercer sobre la síntesis de la proteína de estrés. **(181)*.

Los primeros estudios llevados a cabo al inicio de los años 80 a cerca de la posible correlación entre el antígeno y la hormona fueron realizados en células *MCF-7* humanas (una línea celular de cáncer de mama). Tales estudios sugerían que la síntesis de la proteína *HSP 27* se ve incrementada ante la exposición a estrógenos, lo que depende de la duración y la dosis de esta última y además requiere interacción de la hormona con el receptor. **(169)*

En investigaciones posteriores se ha demostrado que ciertamente los niveles de expresión de *HSP 27* concuerdan con la presencia tisular del receptor hormonal. Sin embargo, dicha concordancia parece estar lógicamente limitada tan solo a aquellos órganos que son diana para hormonas esteroideas como son la mama y los tejidos correspondientes al tracto reproductor femenino. **(93,100,190,198,280,292,293)*.

Ciocca DR. y sus colaboradores obtuvieron evidencias de la modulación hormonal de la proteína de estrés de bajo peso molecular en tejidos humanos normales cuando examinaron biopsias endometriales. Observaron cambios tanto en la localización como en el contenido de *HSP 27* durante las diferentes fases del ciclo menstrual. Así, *HSP 27* fue predominantemente expresada durante la fase secretora, la cual se caracteriza por altos niveles de progesterona y moderados de estrógenos. Además, una alta expresión fue observada en la mitad del ciclo coincidiendo con un pico de estrógenos. Estos resultados sugieren que en el endometrio *HSP 27* puede estar regulada por la acción sinérgica de estrógenos y progesterona. **(190)*.

Sin embargo, y aunque parece esta una idea bastante admitida, siempre ha tenido sus puntos de controversia. Así, los mismos autores detectaron la presencia de *HSP 27* en cérvix, pero esta vez no observaron significantes variaciones en cuanto a la presencia de la proteína en el epitelio cervical durante las distintas fases del ciclo menstrual. **(292)*.

Las investigaciones a cerca de la expresión de *HSP 27* en función de la presencia de estrógenos y el receptor hormonal han ido aún más lejos ampliando el campo de estudio a tejidos neoplásicos.

En muestras tumorales de mama se ha demostrado repetidamente que la presencia de la proteína de estrés se correlaciona con la detección de receptores de hormonas esteroideas; principalmente receptores de estrógenos. Además, tales receptores son generalmente considerados como marcadores predictivos de un buen pronóstico en cánceres de mama localizados o de estado avanzado.

**(167,169,197,294,295,296,297,298,299)*.

Asimismo, en cultivos de células humanas de cáncer de mama se ha demostrado que el gen *HSP 27* puede ser inducido por estradiol o choque térmico. Sin embargo, la expresión de tal proteína de estrés no es inducida por la exposición de las células de cáncer de mama *MDA-MB-231* a estrógenos porque tales células se caracterizan por no tener receptores para la hormona. No obstante, estas células si muestran inducción de *HSP 27* por choque térmico. ^{*(93)}.

El análisis de *HSP 27* junto al *RE* en muestras tisulares de cáncer endometrial llevó a los autores a considerar a la proteína de estrés como un posible marcador bioquímico de la respuesta endometrial estrogénica. ^{*(295,300)}. Aunque en el carcinoma escamoso del cérvix uterino la presencia de la proteína de choque térmico parece ser independiente de la presencia del receptor de estrógenos. Sin embargo, resulta ser un hecho lógico teniendo en cuenta que estos tumores son generalmente considerados como hormona-independientes. ^{*(198,270)}.

Hasta el presente los hallazgos indican que *HSP 27* es regulada hormonalmente y está asociada al *RE* solo en ciertos tejidos y bajo ciertas circunstancias, pero que en otros tejidos y/o bajo otras situaciones su expresión es independiente de la regulación hormonal. Entonces su detección en tejidos diana para esteroides debería ser considerada solo como un método para identificar tumores de respuesta a hormonas o relacionados con el *RE*. ^{*(181)}.

A veces se ha intentado dar una explicación funcional a la correlación de *HSP 27* con el *RE*. Así, la proteína de estrés podría cooperar en el acompañamiento de los receptores esteroides hasta la interacción de la hormona con la proteína receptora. ^{*(301)}. Desde que *HSP 27* se asocia con la actina se sugiere que puede

jugar un papel en el transporte del receptor de esteroides desde el citoplasma al núcleo. **(173)*.

No obstante, y aunque se trate de un tema bastante estudiado, nunca serán suficientes las investigaciones que nos ayuden a comprender claramente las observaciones llevadas a cabo. Las líneas actuales de trabajo siguen enfocadas a elucidar las cuestiones que surjan alrededor de la aparente relación entre *HSP 27* y *RE*.

Pero *HSP 27* no ha sido la única proteína reconocida como dependiente de la presencia de receptores hormonales. *P29* es también una fosfoproteína en serina asociada al receptor de estrógenos. **(199,200,302,303)*. En 1991 tal punto de coincidencia entre ambas proteínas llevó a 2 laboratorios independientes a profundizar en el tema, identificando simultáneamente a *HSP 27* y *p29* como la misma entidad. **(304,305)*. 11 años antes ya había sido inicialmente sugerido este hecho mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor miometrial de estradiol parcialmente purificado. **(306)*. Y es que, correlaciones similares a las observadas para *HSP 27* con el *RE* han sido encontradas para *p29* mediante el estudio histoquímico de muestras tumorales de mama. Los hallazgos indican que los tumores positivos para el *RE* expresan *p29*. **(307,308)*.

Las investigaciones se aplican en nuevas direcciones con el fin de conocer otras interesantes implicaciones de las proteínas que nos ocupan. De este modo, se han realizado numerosos estudios cuyas conclusiones apuntan sobre la posible participación de las *HSP's* en diversas funciones inmunológicas. **(309,310,311,312,313,314,315,316,317)*. (FIGURA 3).

La localización de proteínas de choque térmico de la familia *HSP 70* en la superficie de determinadas células tumorales ha sido el punto de partida para profundizar en tales estudios. ^{*(210,233)}. Células tumorales de una línea de Sarcoma de Ewing's expuestas a una temperatura no letal de 41.8°C mostraron un incremento en la expresión de *HSP 72* en su superficie. Además, estas células resultaron ser más susceptibles a lisis por células *NK* (Natural Killer o Asesinas Natas). ^{*(318)}. En contraste, células derivadas de individuos sanos (fibroblastos, monocitos, linfocitos de sangre periférica) no presentaron *HSP 72* en superficie celular independientemente de la temperatura a la que fueran expuestas. ^{*(210)}. Datos como estos apoyan la participación de algunas *HSP's* como antígenos tumorales o como transportadores de péptidos tumorales antigénicos desencadenantes de una respuesta inmune natural. ^{*(150,230)}.

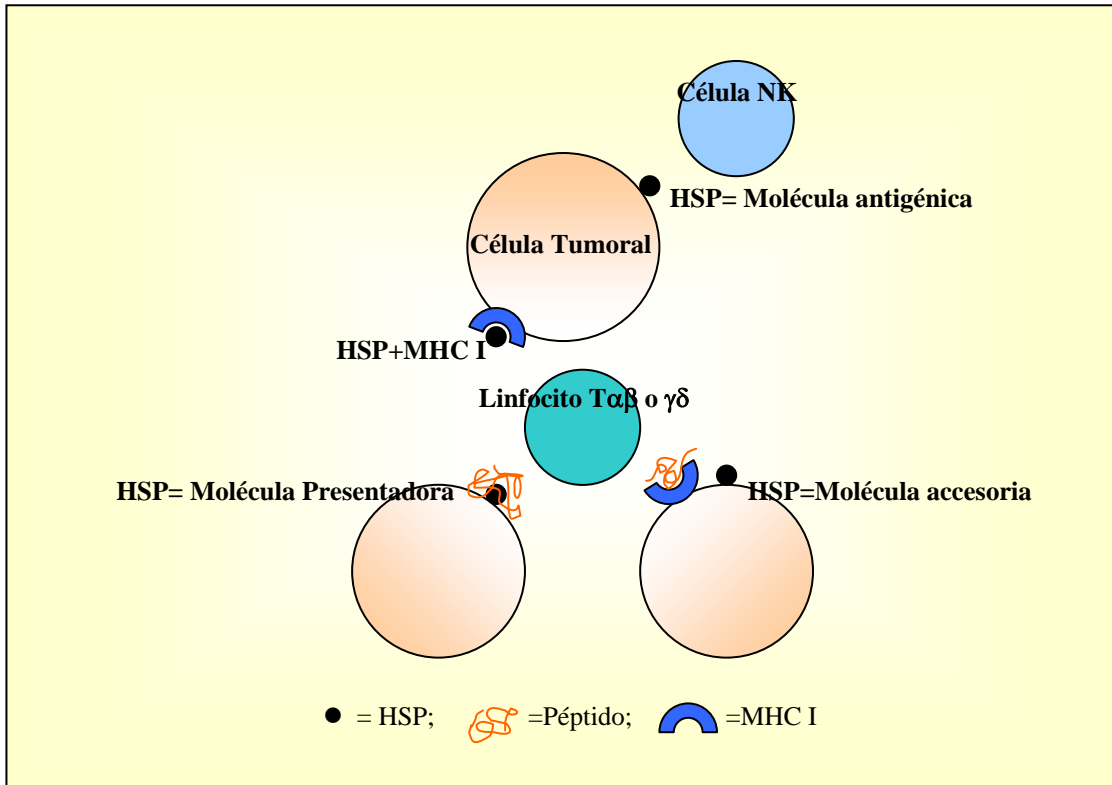
Quizás las *HSP's* actúen como determinantes antigénicos en una respuesta inmune adquirida para algunos subgrupos de células *T* $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. ^{*(319,320)}. La posibilidad de que células *T* $\gamma\delta$ citotóxicas, una minoría dentro de la población de células *T* presente en tejidos epiteliales y sangre periférica, reconozca epítomos derivados de *HSP's* ha sido sugerido en numerosas ocasiones y un incrementado número de estas células acompañado de una sobreexpresión de tales proteínas ha sido hallado en tumores. ^{*(237)}. Las *HSP's* podrían ser alteradas durante la transformación sufrida por las células de un tumor y ser presentadas por moléculas del *MHC* (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de clase I en la superficie de células tumorales donde interaccionarían con células *T* que expresaran *TCR's* (Receptores de Células T) $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. ^{*(237,321,322,323)}.

Por su parte, *Srivastava PK.* y *Heike M.* proponen que las *HSP's* juegan un papel en presentación antigénica y no como antígenos tumorales, ya que tales

proteínas se expresan sin polimorfismos o diferencias estructurales tanto en células normales como tumorales. ^{*(324)}. Las *HSP's* podrían funcionar como moléculas presentadoras de antígenos de una manera similar a como lo hacen las moléculas del *MHC* de clase I o II; o tal vez, actúen como moléculas accesorias para la presentación antigénica. ^{*(325)}. Así, se ha sugerido un papel para *HSP 70* en la presentación del antígeno *p53*. *HSP 70* puede intervenir en la translocación de la proteína *p53* mutante desde el núcleo a la membrana celular en donde esta última jugaría un papel inmunogénico. ^{*(215)}.

Si a todos estos datos le sumamos que en varios estudios se ha observado que los tumores relacionados con la expresión de proteínas de estrés muestran asiduamente infiltración linfocitaria, resulta fácil admitir una posible participación de las proteínas de choque térmico en funciones relacionadas con nuestro sistema de defensa inmune. ^{*(152,326,327)}.

FIGURA 3:



Posibles implicaciones de *HSP*'s en funciones inmunológicas.

Resultan especialmente interesantes las investigaciones llevadas a cabo a cerca de la aparente implicación que las proteínas de choque térmico muestran en la resistencia o sensibilidad celular a ciertas drogas empleadas de manera más o menos habitual en las terapias anticancerígenas. Muchas han sido las proteínas, situaciones y drogas analizadas en este sentido y parece claro que: *a)* el fenómeno de resistencia-sensibilidad afecta a algunas *HSP*'s y de entre ellas quizás la más implicada sea *HSP 27*; *b)* se manifiesta en situaciones de alteración de la expresión celular de proteínas de choque térmico; *c)* ha sido demostrado en el tratamiento con muy diversas drogas entre ellas actinomicina D, adriamicina, colchicina, vincristina, cisplatina, etopósido, etc. Aunque sin duda el agente

quimioterápico mas estudiado en relación con las proteínas de estrés ha sido la doxorubicina. ^{*(328)}.

Los primeros trabajos realizados en la segunda mitad de los años 70 y primera de los 80 demostraban que cuando las células tumorales eran expuestas secuencialmente a un primer tratamiento hipertérmico no letal previo a la administración de un seguido tratamiento quimioterápico, el segundo resultaba ser menos efectivo de lo que cabría esperar. ^{*(329,330,331,332)}. El hallazgo podía sugerir que las *HSP's* supuestamente inducidas en el primer tratamiento, tal vez estuvieran envueltas en la resistencia a las drogas empleadas secundariamente y que de otro modo serían citotóxicas. De una manera más sencilla, las proteínas de estrés inducidas térmicamente posiblemente protegían a las células del subsiguiente daño químico.

De un modo similar, aunque esta vez a la inversa, se ha encontrado que diversos agentes quimioterapéuticos son capaces, al igual que la hipertermia, de inducir incrementos en los niveles de algunas proteínas de choque térmico. ^{*(158)}. Entre tales agentes destacan la doxorubicina, etopósido, colchicina, vincristina, cisplatina y bleomicina. Pues bien, se estima que pretratamientos con tales drogas inducen termotolerancia. ^{*(81,84,329,333,334)}.

Del mismo modo que la termotolerancia es una propiedad por la que las células expuestas a un choque térmico no letal llegan a ser resistentes a temperaturas que de otro modo serían mortales, lo que se ha denominado resistencia cruzada o multi-drogo-resistencia (*MDR*) se trataría de un fenómeno relacionado por el cual al tratar las células termotolerantes con uno o más agentes quimioterapéuticos se observa resistencia a estas y otras drogas. Ambas, termotolerancia y *MDR*, son

inducidas por calor y opuestas a los efectos terapéuticos de la hipertermia y quimioterapia. ^{*(335)}.

Hasta el momento los resultados parecían fáciles de interpretar. Sin embargo, había que demostrar de algún modo que ciertamente eran las proteínas de choque térmico y no otras causas las responsables del fenómeno de resistencia. Fue entonces cuando algunos autores optaron por la puesta en marcha de experimentos en los que las células eran modificadas genéticamente para que sobreexpresaran una determinada *HSP* y así ver si tales células eran resistentes o sensibles a algunas drogas. De este modo, resultan especialmente significativos y dignos de mencionar los experimentos llevados a cabo por *Huot J.* y su equipo, quienes transfectaron el gen *HSP 27* humano a células ováricas de hámster chino y seguidamente testaron su resistencia a una variedad de drogas citotóxicas, encontrándose con que las células que sobreexpresaban la proteína de choque térmico eran resistentes a agentes antitumorales como doxorubicina, colchicina y vincristina. ^{*(175,336)}. Resultados concordantes obtuvieron *Oesterreich S.* y sus colaboradores en diferentes líneas celulares de cáncer de mama humano cuando de nuevo experimentos de transfección demostraron que las células modificadas genéticamente para que sobreexpresaran *HSP 27* mostraban una más elevada resistencia a doxorubicina mientras que en ausencia de la proteína se demostró sensibilidad a la droga. ^{*(275,337)}.

Simultáneamente, algunos autores sugerían que no solo *HSP 27* se asociaba con la resistencia a doxorubicina, sino que este era un fenómeno aplicable igualmente a la proteína de alto peso molecular *HSP 70*. *Ciocca DR.* y sus colaboradores hallaron en el análisis de células de cáncer de mama que tanto la proteína de alto como la de bajo peso molecular están implicadas en resistencia a

doxorubicina aunque no a otras drogas ensayadas tales como colchicina, 5-fluorouracil, cisplatina o actimomicina D. El estudio revelaba que niveles elevados de tales proteínas de estrés no se asociaban con multi-drogo-resistencia.

*(81).

Y es que, no todos los trabajos llevados a cabo acerca de la posible relación entre *HSP's* y la resistencia celular a algunas drogas defienden la existencia de tal asociación. *(338,339). Muestras tumorales de 90 pacientes con carcinomas de pulmón de células no pequeñas no tratados previamente fueron investigadas inmunohistoquímicamente para la expresión de *HSP 70*. Adicionalmente, la resistencia a doxorubicina de tales células fue determinada. No se pudo hallar asociación alguna entre resistencia a doxorubicina y *HSP 70*. Del mismo modo que no se encontró correspondencia alguna entre *HSP 70* y la expresión de determinadas proteínas relacionadas con el fenómeno de resistencia como son P-glicoproteína 170 (relacionada con *MDR*), topoisomerasa II y timidilato sintasa (son diana para numerosos agentes antitumor) o metalotionina (protege de la toxicidad de diferentes drogas). *(206).

Algunas veces el enlace ha quedado establecido entre la sobreexpresión de la proteína de estrés *HSP 27* y la sensibilidad celular a algunos agentes. *(340).

Schardt C. y sus colaboradores examinaron la expresión de diferentes *HSP's* en líneas de células tumorales humanas con resistencia adquirida a cisplatina y doxorubicina empleando para ello Northern e inmunoblots. En las líneas celulares resistentes a doxorubicina, al igual que en las resistentes a cisplatina, no había o disminuyó la expresión de *ARNm HSP 27* en comparación con las líneas parentales. *(176).

Un año más tarde en el estudio de varias líneas de células tumorales con sensibilidad intrínseca a cisplatina (*cDDP*), una de las drogas quimioterapéuticas más frecuentemente usadas en clínica, *Hettinga J.V.E.* y su equipo demostraron que niveles altos de expresión de la proteína *HSP 27* se relacionaban con un aumento en la sensibilidad a la droga. Del mismo modo, la expresión de *HSP 27* fue analizada en 2 grupos de líneas celulares de tumores humanos con resistencia a *cDDP* esta vez adquirida *in vitro*. En ambos grupos resistentes disminuyó la expresión de *HSP 27* en comparación con las células parentales sensibles. Las conclusiones de este interesante trabajo son claras; una alta expresión de *HSP 27* se relaciona con una alta sensibilidad al tratamiento con *cDDP* en algunos tipos de tumores. Sin embargo, no pudo establecerse correlación alguna entre otras proteínas analizadas en el mismo trabajo (*HSP 90*, *HSP 73*, *HSP 72* y *HSP 60*) y la sensibilidad a la misma droga. **(158)*.

Los resultados obtenidos por los equipos de *Schardt C.* y de *Hettinga J.V.E.* están en concordancia con aquellos datos clínicos que indican que altos niveles de *HSP 27* en tumores se correlacionan con un buen pronóstico. En pacientes con cáncer de mama metastásico que recibieron quimioterapia paliativa la expresión de *HSP 27* parecía vinculada a una mejor respuesta al tratamiento. **(341)*.

No obstante, en ciertas ocasiones no fue posible observar ningún tipo de relación entre la proteína y una respuesta al tratamiento. La influencia de *HSP 27* sobre la respuesta a quimioterapia fue analizada en 13 pacientes de fibrohistiocitoma maligno que recibieron tratamiento quimioterapéutico. Los pacientes de tales sarcomas que expresaban *HSP 27* no eran más sensibles a la quimioterapia que los tumores negativos para la misma proteína de estrés. **(157)*.

A pesar de la ambigüedad de los resultados obtenidos en lo referido a la posible participación de las *HSP's* en la resistencia-sensibilidad a determinados fármacos anticancerígenos, quizás tales estudios hallan dado pie para comenzar nuevas investigaciones, esta vez a cerca de la posible colaboración que las proteínas de estrés nos puedan ofrecer en la búsqueda de una terapia frente al cáncer. Muchos estudios han centrado sus esfuerzos en esta dirección obteniéndose a veces resultados muy sugerentes.

Así, considerando que la manipulación de la expresión de *HSP's* podría ser una diana terapéutica para reducir el detrimento celular, *Morino M.* y su equipo han investigado el efecto de los flavonoides, un amplio grupo de sustancias derivadas de plantas vasculares, sobre la expresión de algunas *HSP's* en varias líneas de células tumorales humanas. Tales sustancias inhibieron la expresión de *HSP 27* y *HSP 72/73* entre otras proteínas de choque térmico. Los resultados sugerían un efecto farmacológico de los flavonoides en enfermedades relacionadas con la expresión anómala de proteínas de estrés. ^{*(342)}.

A veces, ciertas investigaciones descubren posibles y sorprendentes aplicaciones para algunas proteínas de choque térmico. Sin duda, su participación en la inmunoterapia del cáncer analizada en ratones por *Tamura Y.* y su equipo ha sido uno de los estudios más expectantes de los últimos tiempos, a pesar de que 11 años antes otro autor (*Srivastava PK.*) predijera unas conclusiones similares. ^{*(343,344)}. En el tratamiento terapéutico de una variedad establecida de cánceres espontáneos y de origen experimental, *Tamura Y.* y sus colaboradores hacen uso de preparaciones de proteínas de choque térmico derivadas de las células del cáncer autólogo y no de otro. Cierta retardo en la progresión del cáncer primario, una reducción de la capacidad metastásica del tumor y en

definitiva una prolongación de la vida fueron algunas de las consecuencias observadas tras la aplicación de la inmunoterapia. Además, los resultados muestran la eficacia de la terapia sin necesidad de identificar los epítomos antigénicos específicos del tumor. Las *HSP's* purificadas de las células, entre ellas *HSP 70*, se encontraban asociadas con un amplio rango de péptidos derivados de las mismas de tal modo que las proteínas de estrés acompañan al repertorio antigénico de las células de las cuales habían sido purificadas. Tal repertorio antigénico puede consistir en péptidos que se tornan antigénicos debido a las propias mutaciones cancerígenas. Como las mutaciones son aleatorias y muchas, un repertorio viene a ser como una huella digital la cual tiene pocas posibilidades de repetirse. La inmunización con preparaciones de *HSP's* derivadas de tumores permite acceder a la huella digital antigénica de un cáncer sin necesidad de identificar el repertorio para cada paciente. La terapia con complejos *HSP*-péptido permite obtener potentes respuestas de células *T* contra los péptidos y las células de las cuales las proteínas de choque térmico han sido extraídas. **(315,343)*.

El reconocimiento de las *HSP's* como posibles antígenos tumorales o como quizás nuevas formas de moléculas presentadoras de antígenos puede representar en un futuro una nueva dirección para el desarrollo de vacunas frente al cáncer basadas en la naturaleza conservada de las *HSP's* y las características de los péptidos que transportan o presentan. **(150)*.

Por otra parte, quizás una de las estrategias terapéuticas más aplicadas en la historia de la Medicina ha sido y es la hipertermia. La terapia de choque térmico puede tener efectos terapéuticos en cáncer y son particularmente importantes los efectos clínicamente beneficiosos obtenidos cuando se combina la hipertermia

con agentes y radiaciones anticancerígenas. ^{*(345,346,347)}. Pues bien, desde que la hipertermia ha sido relacionada con la expresión celular de proteínas de estrés capaces de generar fenómenos de termotolerancia y multi-drogo-resistencia que pueden peligrar el tratamiento, resultarían interesantes y de gran utilidad las investigaciones que nos ayuden a esclarecer las funciones que las *HSP's* puedan ejercer en el éxito o fracaso de una terapia hipertérmica antitumoral. ^{*(150)}.

Pero, sin duda el arma más eficaz que tenemos hasta el momento para la lucha contra el cáncer es el establecimiento de un diagnóstico temprano y acertado que nos ayude a poner fin a la enfermedad. Quizás, sea esta la razón por la que algunos de los estudios de mayor impacto son aquellos que se refieren a la probable aplicación que pudieran tener las proteínas de estrés como marcadores tumorales. De este modo, resultan varios los trabajos que implican a las proteínas *HSP 70* y *HSP 27* como presuntos indicadores de las formas oncológicas.

La búsqueda de marcadores los cuales identifiquen específicamente células tumorales es una prioridad si uno desea eliminar las células tumorales sin dañar a las células normales más cercanas. Los últimos candidatos llamados “antígenos tumorales” son las *HSP's*. ^{*(150)}.

La presencia de *HSP's* en la superficie de células tumorales indica que pueden servir como posibles marcadores clínicos. Sin embargo, no está claro como las *HSP's* pueden llegar a la superficie de las células tumorales desde que no se han reconocido secuencias señal. La posibilidad de que sean liberadas por células muertas adyacentes y absorbidas en la superficie de células intactas no ha sido todavía descrito, pero sin duda es una posibilidad a tener en cuenta que de ser así podría explicar en cierto modo la detección de proteínas de estrés también en la

superficie de las células normales adyacentes a las tumorales. No obstante, esta hipótesis no justificaría la detección de las proteínas en el citoplasma y núcleo de las células normales. *(150).

Quizás, las proteínas de estrés nos sirvieran en la detección de células neoplásicas de entre las células normales si se hallaran isoformas diferentes de una misma *HSP* en cada forma celular. En determinadas ocasiones se ha observado que la proteína *HSP27* presente en células tumorales es idéntica en células normales excepto para sus patrones de fosforilación. Así, se ha encontrado 2 isoformas de *HSP27* en la leucemia linfoblástica aguda. Ninguna de las cuales se halla constitutivamente y difieren solo en sus patrones de fosforilación. *(271).

El hecho de llevar a cabo un pronóstico tumoral adecuado es sin duda una tarea de gran interés en oncología. Por ello son múltiples los factores que cada día se ensayan bajo la sospecha de que puedan tener algún valor pronóstico en tumores. Recientes estudios sugieren que la evaluación de la expresión de *HSP's* en este sentido podría ser de gran utilidad y llegando aún más lejos muchas investigaciones han concluido que las *HSP's* podrían ser importantes colaboradores para la elaboración de un pronóstico acertado.

Varios estudios determinan que las proteínas de estrés pudieran ser marcadores de buen pronóstico en diversos tipos de neoplasias. En este sentido el antígeno de bajo peso molecular es considerado como un interesante marcador que caracteriza a un subgrupo de carcinomas de mama ductales invasivos negativos para el receptor de estrógenos como pacientes con un mejor pronóstico. *(153). Algunos autores han sugerido que la evaluación inmunohistoquímica de *HSP 27*

podría servir como un marcador de riesgo a padecer cáncer en lesiones de mama benignas indicando positividad para *HSP 27* un factor de bajo riesgo. ^{*(348)}. Y en el estudio de un pequeño grupo de 51 mujeres con cáncer de mama metastásico se observó que los pacientes con tumores positivos para *HSP 27* tenían mejores consecuencias, un elevado porcentaje de respuesta a quimioterapia y una supervivencia relativamente prolongada. ^{*(341)}. Otros trabajos reiteran que la proteína de 27kD es un marcador de buen pronóstico en el cáncer de mama. La coexpresión del *RE* y *HSP 27* proporciona una mejor respuesta a la terapia hormonal (tamoxifen) frente a aquellas pacientes que expresan solo el receptor. ^{*(307)}.

En otros tipos de tumores la proteína de bajo peso molecular parece ser también de importancia como factor pronóstico. La expresión de *HSP 27* ha sido asociada con un pronóstico más favorable en el fibrohistiocitoma maligno. ^{*(157)}. Asimismo y en el carcinoma endometrial la misma proteína es un indicador pronóstico independiente de las neoplasias con mejores expectativas. ^{*(349)}.

Con relación a la proteína de estrés de 70kD se ha llegado a conclusiones similares. En el análisis de una serie de pacientes con cáncer de mama negativo para *p53* la respuesta al tratamiento era mejor ante una elevada expresión de la proteína de choque térmico. ^{*(207)}.

Sin embargo, los datos existentes a cerca de las posibles implicaciones pronósticas que las *HSP's* pudieran tener en diferentes tipos de tumores comienzan a resultar bastante confusos. Diversos laboratorios han demostrado recientemente que la expresión de *HSP 70* y *HSP 27* se asocia a veces con un pronóstico menos favorable.

Así y en contraposición a referencias previas análisis Western blots, Northern blots e inmunohistoquímicos han sido empleados en el estudio de tumores de mama en los que la expresión de *HSP 27* y *HSP 70* fue considerada como un marcador de mal pronóstico que se correlacionaba con las neoplasias más agresivas, periodos cortos libres de enfermedad y altos índices de recidivas. **(171,197,205,235,350,351,352)**

De un modo similar *HSP 27* ha sido considerada como un indicador pronóstico independiente en el carcinoma gástrico en el sentido de que su negatividad muestra una significativa ventaja de supervivencia frente a los tumores positivos. **(353)**

En algunos casos la positividad de *HSP 27* no parece mostrar correlación alguna con el comportamiento evolutivo del tumor y por lo tanto con las consecuencias últimas en el paciente. Aparentemente el antígeno de 27kD no participa en el pronóstico del cáncer de mama con afectación ganglionar del mismo modo que no parece contribuir al pronóstico de las neoplasias de vejiga o próstata. **(354,355)**

En definitiva la obtención de unas deducciones equilibradas parece haberse convertido en una tarea ciertamente complicada y la gran versatilidad hallada entre los múltiples trabajos hace necesaria la emergencia de nuevas investigaciones que conduzcan a la obtención de unas conclusiones faltas de contradicción.

4.3.-ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

En este apartado analizaremos de una manera independiente los resultados obtenidos en nuestro estudio y trataremos de establecer su validez comparándolos con los datos aparecidos en la literatura.

4.3.1.-EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EN TEJIDO BRONCOPULMONAR NORMAL:

La expresión de algunas proteínas de estrés ha quedado descrita preliminarmente en estructuras normales específicas de pulmón. ^{*(159)}. En mamíferos las células epiteliales de las vías aéreas, los macrófagos alveolares y los neumocitos tipo II han mostrado la expresión proteica de *HSP 70* tras ser estimulada por algunos inductores. ^{*(160,356,357)}. Por el contrario, la ausencia de estudios a cerca de la molécula de 27 kD en estructuras pulmonares normales dificulta su análisis. Así pues, algunas referencias deberán ser tomadas de los exiguos trabajos dedicados a la expresión normal de *HSP 27* sobre tejidos bien distintos del pulmonar.

Por nuestra parte y usando técnicas inmunohistoquímicas *in situ* se demuestra una limitada expresión de la proteína de estrés *HSP 70* en pulmón humano normal. La proteína de alto peso molecular es selectivamente localizada en tan solo determinadas estirpes celulares.

El 92.9% de las vías aéreas centrales y el 92.1% de las vías aéreas periféricas presentan marcaje sobre las células epiteliales ciliadas para la proteína de estrés de alto peso molecular. La abundante presencia de *HSP 70* en el epitelio ciliado de las vías aéreas broncopulmonares es un hecho evidente en nuestros resultados y compartido con otros autores. *(152,239,356).

La propia celularidad que conforma la mucosa de las vías aéreas muestra signos de marcaje selectivo. Así, resulta llamativa la ausencia generalizada de positividad correspondiente al antígeno *HSP 70* sobre las células basales de las vías respiratorias gruesas. Por otra parte la imposibilidad de demostrar la presencia de la misma proteína de estrés sobre las células caliciformes que forman parte de la mucosa aérea es un nuevo signo de su expresión limitada.

Igualmente se analizó la localización de *HSP 70* en las estructuras glandulares que acompañan a las vías aéreas de mayor calibre. Las células epiteliales que tapizan los conductos glandulares muestran un inmunomarcaje similar al que recubre el árbol bronquial y sin embargo, difiere enormemente del escaso marcaje encontrado en las células acinares.

El músculo bronquial mostró positividad en el 60% de los casos examinados. No obstante, la intensidad del marcaje hallado fue siempre débil.

Las únicas células integrantes de la arquitectura alveolar capaces de manifestar el antígeno de 70kD son aquellas responsables de la fabricación del surfactante pulmonar. Los neumocitos tipo II muestran la proteína de estrés en el 62.7% de los casos analizados. Sin embargo, solo en contadas ocasiones otros autores han descrito expresión proteica sobre las mismas células del epitelio alveolar. *(160,357).

Sin duda, se trata de un fenómeno singular en nuestros resultados necesitado de investigaciones más precisas. El resto de componentes celulares que conforman la arquitectura alveolar (neumocitos tipo I, macrófagos alveolares y capilares septales) permanecen impassibles frente a la aplicación del anticuerpo.

Resumidamente advertimos en nuestros resultados un marcaje que denota la presencia relevante de *HSP 70* en tan solo un conjunto restringido de células propias de la arquitectura pulmonar. Las células epiteliales ciliadas de las vías aéreas gruesas, las células no mucosecretoras de las vías aéreas finas, las células ductales de las glándulas submucosas, el músculo bronquial y los neumocitos tipo II fueron los integrantes de tal conjunto.

Otros autores hallan similarmente la presencia de la proteína de alto peso molecular limitada a determinadas estructuras normales del pulmón. No obstante, la concordancia entre resultados no es plena. Es un hecho compartido con otros investigadores el marcaje que denota la presencia de la proteína en cuestión sobre el epitelio ciliado constitutivo de las vías aéreas centrales y periféricas. **(152,239,356)*. Sin embargo, algunas divergencias separan nuestras observaciones de las expuestas en referencias previas que describen la expresión de *HSP 70* en macrófagos alveolares y por el contrario no hallan la proteína sobre células ductales y neumocitos tipo II. **(152,163,239,356,358)*.

Los argumentos capaces de justificar las diferencias de expresión halladas en la comparación de nuestros datos con los resultados de respetables autores son infinitos, sin embargo aquellos que se refieren a los procedimientos técnicos aplicados deben ser sin falta considerados. Y es que, las variaciones en los resultados nos hacen reflexionar en una unificación de criterios en cuanto a los

anticuerpos, sistemas de detección y procedimientos de tabulación utilizados en este tipo de estudios para que los datos obtenidos por los diferentes laboratorios sean completamente equiparables y puedan servir de referencia en estudios posteriores.

Una explicación sencilla para las discrepancias descubiertas podría hallarse simplemente en la concentración de los anticuerpos empleados. ^{*(262)}. No obstante, en el presente estudio aplicamos los anticuerpos a una dilución predeterminada que no deja tinción de fondo en las muestras lo que hace poco probable que sea la concentración de los sueros aplicados la responsable de las divergencias halladas.

Quizás la diferencia en los patrones de tinción radique en las distintas especificidades de los anticuerpos monoclonales empleados. Nuestro suero va dirigido hacia la detección simultánea de los 2 miembros proteicos que conforman la familia *HSP70* (*HSP 72*/inducible y *HSP 73*/constitutiva). Mientras, otros equipos investigadores demuestran exclusivamente la presencia de la proteína *HSP 72* a través de la aplicación de un anticuerpo monoclonal dirigido específicamente hacia un epítipo distintivo de la forma inducible.

^{*(152,239)}.

El grupo de *Bonay M.* analizó años atrás la localización independiente de *HSP 72*/inducible y *HSP 73*/constitutiva en tejidos pulmonares normales a través de la aplicación paralela de técnicas inmunohistoquímicas e inmunoelectroforéticas. Sus resultados sugerían la presencia de ambas formas proteicas en las células epiteliales ciliadas de las vías aéreas cartilaginosas y periféricas. Sin embargo, al aplicar un anticuerpo dirigido hacia la detección de un epítipo común a las dos

isoformas altamente homologas no detectaron positividad alguna por medio de técnicas inmunohistoquímicas aunque sí por inmunoelectroforesis. Tal hecho les llevó a sugerir que los resultados observados se debían al bloqueo del epítipo antigénico común a ambas formas proteicas mediante su interacción con otras proteínas. ^{*(152)}. Así que el determinante antigénico reconocido por nuestro anticuerpo no debe intervenir en la interacción de *HSP 70* con otras proteínas celulares al menos en las células ciliadas que tapizan las vías aéreas como nos permite deducir la positividad hallada en tal ubicación.

Una interpretación similar podría justificar la ausencia de marcaje que hemos observado sobre los macrófagos alveolares. Y es que la localización de positividad en este tipo celular no es un hecho aislado sino que son varios los autores que a diferencia nuestra han descrito en él la acumulación de *HSP 70*. ^{*(152,163,239)}. Tal vez la expresión de la proteína de estrés en macrófagos sea un hecho real y nuestro epítipo queda escondido al interaccionar con algún tipo de molécula que en principio no se localiza en el epitelio de las vías aéreas pero si pudiera estar presente en macrófagos alveolares.

En definitiva la expresión selectiva de la proteína de estrés en cuestión sobre determinadas células normales (células ciliadas de las vías aéreas gruesas y finas, células ductales de las glándulas submucosas, células musculares y neumocitos tipo II) podría resultar de la ausencia en estas pero no en otras células de proteínas que al interaccionar con *HSP 70* bloqueen el determinante antigénico frente al que dirigimos nuestro anticuerpo.

Independientemente de que *HSP 70* intervenga o no en interacciones proteína-proteína que puedan omitir su marcaje en algunas estructuras normales del

pulmón ¿qué significado tiene la evidente expresión observada de la proteína de alto peso molecular en determinados tipos celulares normales?.

La expresión abundante de *HSP 70* en el epitelio normal ciliado que tapiza las vías aéreas centrales y distales es un hecho que compartimos con otros autores. No obstante, la base biológica de tal expresión es desconocida. Algunos investigadores especulan sobre la posible función citoprotectora que la proteína pudiera ejercer en los epitelios ciliados al estar en contacto directo con los contaminantes del aire que inhalamos. *HSP 70* podría ser inducida en las células ciliadas en respuesta al estrés causado por su continua exposición a partículas de polvo, agentes microbianos, oxidantes, ácidos, etc. ^{*(88,152,356)}. Este mismo argumento podría explicar la alta expresión de la proteína de estrés hallada en otras células típicas de la arquitectura pulmonar que igualmente están en contacto directo con los agentes estresantes del aire respirado, tales como las células epiteliales de los conductos glandulares que desembocan hacia la luz bronquial y los neumocitos tipo II que sobresalen en los sacos alveolares.

Sin embargo, y siguiendo este mismo razonamiento, no se entiende por nuestra parte la ausencia de positividad para *HSP 70* en otras células integrantes o adyacentes a los epitelios aéreos como son las células caliciformes, los neumocitos tipo I y los macrófagos alveolares.

Algunos investigadores han relacionado la expresión de *HSP70* más bien con la respuesta inflamatoria que sigue a un fenómeno de agresión celular. *Vignola AM.* y su equipo ponen en marcha un extenso estudio en el cual pacientes asmáticos (enfermedad inflamatoria crónica) mostraron una positividad para la proteína de alto peso molecular sobre diferentes estructuras pulmonares significativamente

más elevada que en los sujetos control. Las conclusiones eran claras y relacionaban la inflamación bronquial con la producción de *HSP*'s. El incremento de *HSP 70* en el asma podría relacionarse con los mediadores de la inflamación liberados proporcionando a las células un mecanismo de defensa frente a ellos. **(239)*.

Los patrones de expresión de proteínas de estrés en células broncopulmonares pudieran ser más bien dependientes de la propia biología celular. *Bonay M.* junto a sus colaboradores defienden que los elevados niveles de expresión correspondientes a *HSP 72* y hallados en los bronquiolos de última generación (bronquiolos terminales y respiratorios) no son más que un reflejo del estado diferenciado de las células integrantes del epitelio más columnar al hallar en disposición adyacente grupos de células cuboidales negativas para la proteína inducible y posiblemente representantes de un epitelio transicional. Así, los patrones de expresión observados para la proteína de estrés reflejarían los diferentes estados de diferenciación del epitelio bronquiolar más que la respuesta a un perjuicio celular. **(152)*.

En este sentido la falta de marcaje para *HSP 70* reconocida por nuestra parte sobre las células basales indiferenciadas integrantes de las vías aéreas gruesas en contraposición a la elevada positividad demostrada sobre el epitelio ciliado contiguo da apoyo a la teoría expuesta por el grupo de *Bonay M.*

Por otra parte, una característica común relaciona a las diferentes estirpes celulares que manifestaron de forma relevante la proteína *HSP 70* de acuerdo con nuestros resultados. Las células ciliadas que tapizan las vías aéreas de diferentes calibres, las células ductales de las estructuras glandulares submucosas y los

neumocitos tipo II integrantes de las paredes alveolares sostienen un origen endodérmico epitelial compartido. Tal vez la naturaleza celular de las estirpes marcadas tenga relación con la expresión proteica hallada.

Independientemente de las razones que expliquen la detección de *HSP70* en pulmón parece ser un hecho comúnmente reconocido el que tal proteína de estrés se localice de manera selectiva en tan sólo determinadas células que conforman la arquitectura pulmonar y que por lo tanto no se trata de un fenómeno que se extiende de modo indiscriminado a todo el parénquima.

Por otra parte, resulta interesante considerar la existencia de co-expresión entre las 2 proteínas de estrés estudiadas (*HSP 70* y *HSP 27*) ya que pudiera ayudarnos a elucidar algún tipo de analogía, dependencia o conexión entre ellas. El hecho de que ambas *HSP's* no hallan sido testadas en la misma muestra (aunque si en el mismo caso) debido a las diferencias de fijación que requería el anticuerpo empleado en la detección de cada proteína hace que nuestro trabajo no sea precisamente el modelo ideal para el análisis de tal co-expresión. A pesar de todo no parece prevalecer ningún tipo de localización coincidente entre las 2 proteínas en similares estructuras broncopulmonares normales de un mismo caso. La falta de co-expresión descrita podría indicar en principio que ambos antígenos son regulados de un modo independiente.

Siguiendo las mismas pautas de estudio aplicadas hasta ahora hemos examinado las características de expresión concernientes a la proteína de estrés de bajo peso molecular en los tejidos broncopulmonares normales integrantes de nuestra serie.

La proteína *HSP 27* se distribuye en estructuras pulmonares centrales y periféricas.

Es de interés destacar la frecuente demostración de *HSP 27* sobre las células basales pluripotentes de aspecto piramidal que forman parte de las vías aéreas de mayor calibre. Sin duda se trata de un fenómeno que llama la atención ante la ausencia de marcaje en el resto del epitelio grueso. Son células indiferenciadas con una elevada capacidad de división para el reemplazamiento de las células ciliadas y caliciformes que integran parte del epitelio bronquial. Tal hecho nos lleva a razonar que quizás la demostración de la proteína de estrés en las células basales no sea más que un reflejo de su elevada actividad proliferativa.

Las células ciliadas de las vías aéreas finas mostraron positividad para la misma proteína de estrés. No obstante y teniendo presentes los datos extraídos del análisis de la proteína *HSP 70* advertimos una importante pérdida de expresión sobre tal ubicación que afecta en frecuencia, extensión e intensidad a la proteína *HSP 27*. Las células caliciformes adyacentes a las células ciliadas en las vías periféricas resultaron ser una vez más negativas ante la demostración de una proteína de choque térmico.

El músculo que acompaña a las vías bronquiales mostró positividad para *HSP 27* en el 76.9% de los casos. El marcaje nunca fue de intensidad fuerte y el promedio de fibras teñidas en cada muestra varió ampliamente.

Las estructuras glandulares submucosas aparecen como organizaciones prácticamente faltas del antígeno citoplásmico. La proteína *HSP 27* no difunde en ningún caso hacia el material mucoso. No obstante, las células ductales

exhibieron la proteína de estrés en el 42.9% de los casos. Se trata de un porcentaje elevado a pesar de que la presencia de la proteína de bajo peso molecular en tal estructura se muestra disminuida en comparación con los resultados concernientes a *HSP 70*.

Por su parte los neumocitos tipo II vuelven a responder ante la búsqueda de antígenos de choque térmico. La proteína de bajo peso molecular se hacía evidente sobre tales células alveolares en el 46.7% de los casos.

El resto de células componentes de la arquitectura broncopulmonar normal no mostró signos de acumulación proteica. Células ciliadas del epitelio bronquial, células caliciformes, glándulas submucosas, células ductales basales, células de reserva, neumocitos tipo I, macrófagos alveolares y capilares septales constituyen un voluminoso grupo con ausencia del antígeno *HSP 27*.

De este modo concluimos que la localización de proteínas de estrés en el tejido broncopulmonar normal se presenta como un fenómeno restringido a tan solo algunas estirpes celulares quedando lejos de ser un hecho indiscriminado. Asimismo y a excepción de su expresión complementaria en el epitelio bronquial demostramos que la proteína *HSP 27* se localiza en similares organizaciones broncopulmonares que *HSP 70*. Si bien el antígeno de 27kD se expresa con menor frecuencia, extensión e intensidad que la forma de elevado peso molecular.

La presencia de la proteína de estrés de bajo peso molecular ha quedado descrita por algunos autores sobre células normales de tejidos bien diferentes al pulmonar. De este modo ha sido demostrada la existencia de inmunoreactividad

en el citoplasma de las células ductales que componen la arquitectura de la mama. ^{*(293)}. Asimismo otros órganos con dependencia estrogénica han sido relacionados con la expresión del antígeno *HSP 27*. ^{*(270)}.

No obstante, la ausencia de marcajes significativos ha caracterizado a un conjunto de muestras derivadas del sistema nervioso central. ^{*(201)}. Tampoco ha quedado demostrada la expresión de *HSP 27* sobre tejidos hepáticos normales aplicados como controles en un específico análisis inmunohistoquímico. ^{*(196)}.

Desde que se sugirió una dependencia hormonal para la proteína de bajo peso molecular muchos investigadores han preferido aplicar sus estudios sobre tejidos diana de estrógenos quedando aparentemente olvidada su supervisión en otros órganos. No obstante, nuestros resultados demuestran la presencia proteica de *HSP 27* en pulmón humano normal en donde queda desentendida una subordinación estrogénica. Quizás, la proteína de estrés de bajo peso molecular se halle presente bajo control hormonal en tan solo algunos tejidos mientras que en otros su expresión queda totalmente exenta de tal regulación.

La ausencia íntegra de trabajos preliminares dedicados al análisis de la proteína *HSP 27* en tejidos pulmonares normales debería ser considerada para la puesta en marcha de nuevas investigaciones en este sentido. Sin embargo, los hechos no se remiten tan solo a *HSP 27*. En general la evaluación de *HSP*'s en muestras normales es escasa en comparación con su extenso estudio sobre tejidos neoplásicos. No obstante, su exploración inmunohistoquímica en situaciones normales podría constituir la llave de acceso hacia un mejor entendimiento en determinadas situaciones de estrés. Tal vez la expresión normal de proteínas de

estrés nos ofrezca interesantes datos a cerca de su biología a tener en cuenta en sucesivas inspecciones bajo comportamiento tumoral.

4.3.2.-EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EN TEJIDO BRONCOPULMONAR NEOPLÁSICO:

Centrándonos en el estudio de las muestras de tejido tumoral que componen nuestra serie hallamos notorias diferencias de expresión en cuanto a las dos proteínas de estrés a las que dedicamos este trabajo y en relación con los tejidos normales considerados. Los tejidos pulmonares neoplásicos en comparación con las estructuras normales muestran signos de una mayor expresión de proteínas de choque térmico.

El 98.9% de los tumores broncopulmonares analizados exhibió inmunomarcaje para la proteína *HSP 70*. El porcentaje medio de células transformadas teñidas por caso fue del 86.06%. Además, 14 neoplasias mostraron una intensidad de tinción débil, 9 moderada, 5 fuerte, 35 variable de débil a moderada, 11 moderada-fuerte y 15 débil-fuerte. Los mismos valores de frecuencia, extensión e intensidad fueron evaluados para cada una de las estructuras broncopulmonares normales consideradas como objeto de estudio en este trabajo. Sin embargo, en ningún caso se sobrepasaron las estimaciones realizadas sobre el tejido tumoral.

Los datos que comparan la expresión de *HSP 27* entre tejidos normales y tumorales resultaron ser también plenamente diferenciales. El 85.6% de las neoplasias analizadas mostró señales de la presencia proteica sobre sus células

transformadas. Se trata sin duda de un elevado porcentaje de expresión que fue siempre diferencialmente menor sobre las estructuras broncopulmonares normales centrales y periféricas consideradas.

En definitiva ambas proteínas de estrés (*HSP 70* y *HSP 27*) denotan la existencia de disimilitudes entre tejidos normales y tumorales. La diferencia de expresión es evidente al reparar en la frecuencia, extensión e intensidad del marcaje que distingue a las proteínas de choque térmico.

Muchos autores han sido testigos de resultados similares. No obstante, tales derivaciones se refieren única y exclusivamente al estudio de *HSP 70*. La falta de trabajos dedicados al análisis de *HSP 27* en muestras broncopulmonares tanto normales como neoplásicas limitó el contraste de nuestros resultados.

La proteína de choque térmico de 70kD se expresa diferencialmente en tejidos normales y tumorales. Las diferencias son estadísticamente significativas según estudios de diversos investigadores. El grupo de *Koomägi R.* analizó inmunohistoquímicamente 20 tejidos tumorales y peritumorales derivados de pacientes diagnosticados con carcinomas pulmonares. La expresión de *HSP 70* fue indiscutiblemente mayor en el tejido transformado en comparación con el tejido normal. El porcentaje de casos positivos ascendía a un 75% de los tejidos neoplásicos y a tan solo un 15% de los normales. ^{*(209)}. En el mismo año *Stammler G.* demostró junto a su equipo un incrementado nivel del *ARNm* correspondiente a la proteína *HSP 70* en tumores pulmonares al examinar paralelamente los tejidos normales adyacentes. ^{*(359)}. Tales demostraciones vienen a confirmar los datos previos de otros prestigiosos autores. *Bonay M.* y *Volm M.*

junto a sus correspondientes equipos de colaboración apreciaron igualmente una sobreexpresión proteica sobre las muestras pulmonares neoplásicas. **(152,206,208)*.

A veces el marcaje observado queda totalmente restringido a las estructuras neoplásicas quedando enteramente omitido en el tejido normal contiguo. *Ferrarini M.* y sus colaboradores obtienen para *HSP 72/inducible* un patrón de tinción citoplásmico y difuso en las células transformadas de los pulmones que investigan. Mientras el estroma normal adyacente era siempre negativo para la misma isoforma proteica. **(237)*. No obstante, este último trabajo nos hace sospechar sobre la extrema importancia que debe tener la forma proteica a la que va dirigido el anticuerpo aplicado. Detalles como este nos llevan a especular que quizás en nuestro estudio estemos detectando exclusivamente la forma *HSP 73/constitutiva* sobre los tejidos normales y que la proteína *HSP 72/inducible* se localiza sola o junto a la isoforma constitutiva únicamente en el tejido tumoral. Si fuese así resultaría lógico el aumento proteico general hallado en los tumores en contraposición con su menor presencia en las áreas normales. La forma constitutiva podría ejercer sus funciones como acompañante molecular en las células normales las cuales al sufrir una transformación neoplásica comenzarían la expresión aditiva de la forma inducible en un intento de restaurar la normalidad celular.

Por su parte *Bonay M.* y su equipo han descrito la expresión de *HSP 72* en 9 de los 15 carcinomas pulmonares que investigan lo que supone que en el 60% de las muestras tumorales quedó demostrada la presencia de la proteína inducible. De este modo se verificaba por técnicas inmunohistoquímicas la elevada localización de al menos un miembro de la familia *HSP 70* en muestras neoplásicas de pulmón. Además, y aunque todos los tumores fueron inmunohistoquímicamente

negativos para *HSP 73*/constitutiva, si se pudo demostrar su presencia en las mismas neoplasias mediante la aplicación de técnicas inmunolectroforéticas. Luego quedaba demostrada la presencia de las 2 formas de la familia *HSP 70* sobre las muestras tumorales. Sin embargo, la total incapacidad de hallar la forma constitutiva sobre las estructuras broncopulmonares normales tira por tierra o en cualquier caso no confirma íntegramente la hipótesis previamente propuesta. *(152).

Sin embargo, y al margen de cualquier especulación, la elevada expresión de *HSP 70* hallada en nuestra serie tumoral es un hecho corroborado por el grupo de *Volm M.* bajo el empleo de los mismos métodos en la valoración de los resultados. El 87.8% de los tumores analizados en nuestro estudio muestra altos grados de positividad para la proteína de elevado peso molecular. Igualmente, y en correlación con tales resultados, *Volm M.* advierte en dos publicaciones consecutivas la existencia de destacados porcentajes de marcaje e intensidad en la mayoría de los carcinomas broncopulmonares que analiza. *(206,208).

Por otro lado, y para el caso de la proteína de choque térmico de 27kD, su abundante presencia ha quedado descrita a lo largo de la bibliografía en tumores de diversos orígenes. Entre ellos los derivados de tejidos que están sometidos a un control hormonal son los que con más frecuencia han sido designados para el análisis de la proteína de choque térmico de bajo peso molecular. Carcinomas de mama, neoplasias endometriales, tumores de cérvix uterino, etc. han sido generalmente los elegidos quedando aparentemente olvidada la descripción de *HSP 27* en otras neoplasias. *(153,197,198,270). Y es que, el hecho de ser reconocida habitualmente como una proteína relacionada con el receptor de estrógenos ha

llevado a restringir su estudio, salvo contadas excepciones, a tumores derivados de tejidos hormona-dependientes.

De este modo y a falta de trabajos que analicen la localización de *HSP 27* en neoplasias broncopulmonares resulta interesante el análisis de nuestros resultados tomando como referencia los datos derivados de la misma demostración antigénica en cánceres de diferente origen sistémico y en principio no sometidos a ningún tipo de regulación estrogénica. Así, independientemente del tejido del que derive el tumor parece ser un hecho generalizado el que las estructuras neoplásicas expresen asiduamente y en amplias magnitudes la proteína de 27kD.

*(156,157,201,204,278).

Tan solo el grupo de *Vargas SO.* describió recientemente una marcada inmunoreactividad para la proteína *p29* asociada al receptor de estrógenos e identificada como la misma entidad que *HSP 27* en casi todos los casos considerados dentro de una extensa serie de 111 carcinomas pulmonares de células no pequeñas. El 98% de las muestras mostró positividad para el antígeno relacionado con el receptor hormonal. *(303).

La descripción correspondiente a la expresión de proteínas de choque térmico de 70 y 27 kD en tumores puede ayudar sin duda a descifrar importantes aspectos sobre su comportamiento neoplásico. Hemos definido como “heterogénea” la distribución correspondiente a ambas *HSP's* y observada bajo el examen microscópico de las muestras tumorales. Las diferencias halladas han sido identificadas entre neoplasias. Asimismo detectamos la presencia de campos tumorales con microheterogeneidad de expresión.

Ante el análisis de nuestros resultados hemos encontrado marcaje para la proteína *HSP 70* en todos los tumores broncopulmonares listados excepto en un solo caso diagnosticado como carcinoma adenoescamoso. La excepción hallada podría explicarse por la presencia de alguna irregularidad en los procedimientos técnicos aplicados como pudieran ser excesos de fijación, descuidos en los procesos de hidratación-deshidratación tisular, errores en la aplicación de la técnica inmunohistoquímica propiamente dicha, defectos de revelado, etc. Sin embargo, los casos diagnosticados como carcinomas epidermoides así como adenocarcinomas mostraron una expresión de la proteína *HSP 70* altamente desequilibrada. Mientras algunos casos exhibieron solo un 10% de las células neoplásicas marcadas en otras muestras se pudo observar la totalidad del tumor teñido. Esto no ocurría en el resto de tipos tumorales estudiados los cuales mostraron siempre más de un 70% de las células transformadas marcadas. Tal vez la variable expresión de *HSP 70* no es una circunstancia exclusiva de los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas sino que pudiera ser un hecho compartido con el resto de la clasificación de tumores pulmonares si no fuera por la escasez de casos de nuestra serie diagnosticados como carcinomas de células grandes, carcinomas de células pequeñas, carcinomas adenoescamosos y carcinoides. Al mismo tiempo y confirmando el desequilibrio descrito la intensidad del marcaje observado también se identificó como altamente heterogénea entre pacientes y a veces dentro de un mismo caso.

De igual forma identificamos una indiscutible heterogeneidad ante la inmunolocalización del antígeno *HSP 27* sobre las muestras tumorales de pulmón consideradas. La intensidad del marcaje volvía a ser variable y el porcentaje de células marcadas oscilaba ampliamente entre las muestras neoplásicas de cualquier tipo histológico. Además, el hecho de disponer de un elevado número

de tumores con ausencia total del antígeno *HSP 27* (hasta 13) disparó aún más la desigualdad entre las muestras.

Otros trabajos hacen referencia a una heterogeneidad similar en la expresión tumoral de las mismas proteínas de estrés argumentando paralelamente sobre las posibles causas que reflejan las observaciones realizadas.

Así, se ha sugerido en distintas ocasiones y sobre muestras tumorales de diversos orígenes que el amplio rango hallado en los niveles de expresión de proteínas de choque térmico no es más que un reflejo de los diferentes estímulos estresantes a los que pueden estar sometidos los pacientes. De igual modo, la generalizada ausencia de uniformidad hallada en cada muestra podría deberse a la extensión del estrés causante de la expresión de *HSP's* a tan solo algunas células de la misma población tumoral y no a todas. *(204,235,328).

En este mismo contexto *Volm M.* junto a sus colaboradores describen como heterogéneo entre individuos y en cada muestra el marcaje obtenido para la proteína *HSP 70* en el estudio de una amplia colección de adenocarcinomas pulmonares. Quizás, el amplio rango de niveles de expresión proteica muestra simplemente el estrés biológico diferencial al que pueden estar sometidos los pacientes fumadores frente a los no fumadores. El humo del cigarrillo es la mayor fuente de agentes inductores para *HSP 70* tales como arsenito sódico, cadmio, etanol o dinitrofenol. De este modo el hábito de fumar podría ser la causa de la sobreexpresión de *HSP 70* en tumores pulmonares. Y es que el 75% de los adenocarcinomas pulmonares correspondientes a los pacientes fumadores que componen la serie de estudio de *Volm M.* muestra una elevada expresión de *HSP 70* confirmándose una significativa correlación entre la proteína y el hábito de

fumar. Además, quedó demostrado que la expresión de *HSP 70* variaba en función del número de cigarrillos consumidos diariamente. **(208)*.

Sin embargo, nuevas hipótesis al margen del estrés inductor de *HSP's* podrían explicar el patrón de marcaje observado. Tal vez la detección de proteínas de choque térmico no se relacione tanto con el estrés sufrido por las células de un tumor sino más bien tenga que ver con la propia heterogeneidad de las poblaciones de células neoplásicas. **(151,156,201)*.

Así, la aparente expresión heterogénea de *HSP 70* hallada en los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas estudiados inmunohistoquímicamente podría resultar al igual que ya se insinuó en tejidos normales del bloqueo de determinantes antigénicos por otras proteínas. La interacción de *HSP 70* en algunas células pero no en otras con los productos proteicos de algunos oncogenes como *p53* podría ser la causa que explicara por qué los porcentajes de células positivas para *HSP 70* varían enormemente de un caso a otro. Siguiendo esta misma línea de investigación se podría explicar también las variaciones observadas en la intensidad del marcaje. Las células tumorales fuertemente marcadas deben tener una mayor proporción de proteína de choque térmico libre y sin interaccionar con proteínas oncogénicas. *Bonay M.* y su equipo ya consideraron previamente la hipótesis de bloqueo de epítomos por interacciones proteína-proteína aunque fue rechazada de inmediato cuando notaron que los análisis de la expresión de *HSP 72/inducible* por técnicas inmunohistoquímicas y Western blots daban resultados concordantes. **(152)*.

Ante el fracaso de hipótesis anteriores *Bonay M.* se aventuró en afirmar que la heterogeneidad hallada en la expresión de *HSP's* se relaciona claramente con el

grado de diferenciación de las células tumorales puesto que en la mayoría de los casos que él mismo diagnosticó como carcinomas pulmonares de células escamosas era inusual que todas las células del tumor fueran positivas con la misma intensidad para *HSP 72*/inducible. Las células pequeñas e indiferenciadas usualmente presentes en la periferia de los nódulos tumorales eran a menudo fuertemente positivas mientras que las células más diferenciadas fueron débilmente reactivas. *(152).

Consideraciones de otro tipo han sido al mismo tiempo estimadas en la evaluación de nuestros resultados. Y es que resulta fácil pensar que la heterogeneidad hallada tanto en la proporción de células marcadas como en la intensidad de la tinción podría deberse a excesos en la fijación de determinadas zonas tisulares. El hecho de encontrar los defectos de marcaje en la periferia de las muestras tumorales hace que nos inclinemos solo en algún caso aislado por esta justificación. Sin embargo, y en la mayoría de las muestras, la próxima disposición individual de las células marcadas de aquellas que permanecen inalterables ante la aplicación de los anticuerpos correspondientes hace casi impensable que se pueda tratar de un artefacto.

Por su parte *Vargas SO.* junto a su equipo describen la expresión frecuente del antígeno *p29* asociado al receptor de estrógenos a modo de parches de intenso marcaje sobre un conjunto de adenocarcinomas pulmonares al mismo tiempo que identifican una acentuación de la inmunoreactividad en las zonas periféricas de algunos casos diagnosticados como carcinomas de células escamosas. *(303).

El aprecio de otros valores como el patrón de distribución intracelular correspondiente a las dos proteínas de estrés que nos interesan puede ofrecernos

nuevas aportaciones para un mejor conocimiento de la biología proteica en tumores.

De esta forma, la demostración de la proteína de estrés de 27 kD exclusivamente en el compartimento citoplásmico de las células tumorales analizadas es un hecho que compartimos con otros autores que han centrado sus estudios en muestras neoplásicas de diferente origen tisular. **(153,156,157,171,181,189,201,303)*. A veces este patrón de marcaje citoplásmico ha sido descrito como difuso, mientras que en otras ocasiones se ha definido una distribución más bien granular. **(157,189)*. Quizás, la disposición granular denote la formación de agregados o complejos de los cuales forme parte la proteína de estrés. **(181)*.

Por su parte hemos hallado el inmunomarcaje correspondiente a la proteína *HSP 70* en disposición tanto citoplásmica como nuclear sin ninguna preferencia de localización aparente. Otros autores confirman la misma distribución aleatoria y no encuentran justificaciones que expliquen las observaciones realizadas.

En el estudio de varias líneas tumorales (algunas de pulmón) se describe un patrón de distribución intracelular heterogéneo para la proteína *HSP 72/inducible*. Así, la proteína de estrés se consignaba mayormente al compartimento nuclear más que al citoplásmico y aunque generalmente se localizaba intracelularmente también se pudo detectar en la superficie de algunas líneas de células tumorales. **(151)*.

Sin embargo, *Volm M.* y su equipo describen como exclusivamente citoplásmico el marcaje obtenido para la proteína *HSP 70* en el estudio de una

serie de carcinomas de células no pequeñas. ^{*(206,208)}. Quizás las características de los anticuerpos empleados en la detección de la proteína sea responsable de la restringida localización del marcaje al compartimento citoplásmico.

La importancia que pueda tener la determinación de las proteínas de choque térmico de 70 y 27 kD en el comportamiento de los pacientes con cáncer de pulmón nos ha llevado a ampliar los estudios referidos a sus correspondientes expresiones en tumores broncopulmonares. Si además, consideramos el gran interés demostrado entre los investigadores por aquellos factores implicados en el pronóstico del cáncer de pulmón en un intento de erradicar la enfermedad, quizás resulte de utilidad la búsqueda de asociaciones entre la expresión de ciertos antígenos tumorales junto a conocidos e interesantes parámetros pronósticos.

Así, hemos analizado la expresión de *HSP 70* y *HSP 27* en nuestra serie de 90 neoplasias broncopulmonares en paralelo a algunos reconocidos factores histoanatomopatológicos de interés pronóstico en el cáncer de pulmón. Los parámetros considerados son el tamaño del tumor, el número de ganglios linfáticos afectados, el tipo histológico, el grado de diferenciación neoplásica y el estadiaje.

En tal estudio comparativo descubrimos que la falta de expresión de la proteína de 70kD parece asociarse con los tumores de mayor diámetro ($p>0.05$). Por el contrario la ausencia de expresión correspondiente a la proteína *HSP 27* pudiera verse influenciada por los tumores de menor tamaño ($p>0.05$).

Resultan escasos los estudios aplicados en este sentido y de entre ellos prevalecen los trabajos desarrollados sobre tejidos neoplásicos de diferente

origen que dudan respecto a la expresión de ambas proteínas de choque térmico en dependencia del tamaño del tumor. **(153,157,207,360)*. Tan solo *Thor A.* y sus colaboradores hallaron asociaciones en el estudio de una serie de carcinomas primarios de mama. Para tal grupo la sobreexpresión correspondiente a la proteína de 27kD parece ser función de un tamaño tumoral avanzado. **(197)*.

Parece intuitivo pensar que un tumor de mayor diámetro tendrá mas posibilidades de metastatizar hacia los ganglios linfáticos regionales en tanto y cuanto debe tener una mayor actividad proliferativa. La afectación ganglionar constituye el segundo factor histoanatomopatológico considerado como parte fundamental de nuestro trabajo y los datos de expresión referidos al tamaño tumoral parecen concordar con los resultados que relacionan las proteínas de estrés con la afectación de los ganglios linfáticos regionales. Y es que *HSP 70* parece mostrar sus preferencias de expresión sobre los tumores exentos de diseminación ganglionar ($p>0.05$). Por su parte la negatividad de la proteína de 27kD parece aumentar en los tumores no metastásicos ($p>0.05$). Sin embargo, la capacidad de las células tumorales para dividirse no predice por sí misma las posibilidades de metástasis. En este sentido ambos factores pronósticos (tamaño tumoral y afectación ganglionar) deberían considerarse como parámetros independientes en tanto que el diámetro del tumor no debe condicionar en principio la presencia de metástasis ganglionares.

En apoyo de nuestros resultados *Lemieux P.* y su equipo verificaron su hipótesis a cerca de la posible influencia que la proteína *HSP 27* pudiera tener sobre la capacidad metastásica e invasiva de ciertas líneas celulares de cáncer de mama en humanos. La sobreexpresión de la proteína de bajo peso molecular por tales células resultó en un incremento significativo en su capacidad invasiva y de

adhesión aunque la motilidad celular se vio menguada. La correlación directa entre los niveles de *HSP 27* y metástasis ha sido demostrada mediante un ensayo in vivo que mide el número de metástasis al pulmón en ratones inyectados con células recombinantes para *HSP 27*. ^{*(361)}.

En el estudio de un conjunto de carcinomas primarios de mama ha quedado también descrita la sobreexpresión del antígeno de bajo peso molecular sobre los tumores con afectación ganglionar. ^{*(197)}. Sin embargo, otros trabajos no hallan correlación alguna entre la expresión de marcadores de choque térmico y la presencia de metástasis ganglionares, lo que nos lleva a buscar afinidades en nuevos parámetros. ^{*(153)}.

Las 90 neoplasias broncopulmonares que integran nuestra serie fueron cuidadosamente catalogadas bajo las últimas pautas propuestas por la *OMS* para la clasificación histológica del cáncer de pulmón (1999). ^{*(63,249)}. Así, 51 tumores quedaron diagnosticados como carcinomas de células escamosas, 25 adenocarcinomas, 2 carcinomas adenoescamosos, 6 carcinomas de células grandes, 1 carcinoma de células pequeñas y 5 carcinoides.

Siguiendo el mismo modelo de análisis aplicado hasta ahora hemos querido analizar si existe algún tipo de asociación entre la expresión de proteínas de estrés y los tipos histológicos en que se agruparon los tumores. En nuestros resultados hallamos que la expresión de *HSP 70* parece relacionarse con las neoplasias más agresivas (carcinomas indiferenciados de células grandes y carcinomas indiferenciados de células pequeñas) ($p > 0.05$). No obstante, la proteína de 27kD parece obedecer a un patrón de expresión inverso en tanto que pierde expresión en las mismas neoplasias indiferenciadas ($p < 0.05$).

Por su parte *Bonay M.* y sus colaboradores manifiestan la inexistencia de correlatividad entre la expresión de *HSP 72*/inducible y la histología según la cual se clasificó una incompleta serie de 15 carcinomas broncopulmonares constituida por 9 carcinomas epidermoides, 5 adenocarcinomas y 1 carcinoma indiferenciado de células grandes. **(152).*

El grupo de *Hitotsumatsu T.* describió la expresión del antígeno *HSP 27* en una extensa variedad de tumores cerebrales. La proteína de bajo peso molecular era demostrada con diferente positividad entre los tipos histológicos descritos. Sin embargo y en este caso la proteína mostraba una mayor expresión en las variantes histológicas anaplásicas. **(362).*

Como parte interesante de nuestros resultados hallamos que el 64.7% de los tumores tipificados como carcinomas de células escamosas manifiestan una elevada positividad para el antígeno de bajo peso molecular. Por otra parte el 32.0% de los adenocarcinomas y el 33.3% de los carcinomas de células grandes demostraron una expresión comparable para la misma proteína de estrés. Tales demostraciones surgen en concordancia con los datos descritos por el grupo investigador de *Vargas SO.* al definir una significativamente mayor expresión proteica sobre el conjunto de carcinomas epidermoides en comparación con el resto de carcinomas de células no pequeñas que analiza. Además, el mismo equipo manifiesta que dentro del conjunto de carcinomas estudiados son los indiferenciados de células grandes los que menos inmunoreactividad demuestran siendo esta habitualmente focal. **(303).*

El grado de diferenciación tumoral constituye un importante parámetro a considerar en el cáncer de pulmón y como ante otros reconocidos factores

pronósticos investigamos su posible influencia sobre la expresión de proteínas de choque térmico.

Los cánceres pulmonares analizados se clasificaron en grados del I al III a medida que aumentaba la anaplasia o falta de diferenciación. Bajo la consideración de tal pesquisa hemos encontrado los siguientes resultados:

- Las proteínas de choque térmico parecen expresarse en dependencia del grado de diferenciación con que se subclasificaron los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas reunidos. La correlación admitida afecta a las dos proteínas de estrés que hemos venido estudiando hasta ahora (*HSP 70* y *HSP 27*).
- La falta de expresión de *HSP 70* parece asociarse con grados histológicos bajos correspondientes a neoplasias bien diferenciadas ($p > 0.05$). Resultados similares han sido hallados en las investigaciones concernientes a la proteína de estrés de bajo peso molecular ($p > 0.05$).
- La positividad hallada para ambas proteínas de estrés parece aumentar en paralelo con el grado histológico hasta las neoplasias de diferenciación intermedia (II-II/III). Y es que la negatividad proteica pudiera incrementar en las neoplasias de grado III. Sin embargo, el escaso número de muestras diagnosticadas como carcinomas epidermoides de alto grado ofrece dudas sobre la pérdida real de expresión de *HSP's* en los tumores más indiferenciados.

Pocos autores han centrado sus estudios en la posible implicación que el grado tumoral pudiera ejercer sobre la expresión de proteínas de choque térmico. Tal

hecho hace que las posibles comparaciones de nuestros resultados con los de otros investigadores sean por poco nulas. Sólo el equipo de *Bonay M.* halla que la expresión de *HSP's* en carcinomas broncopulmonares de células escamosas está estrechamente relacionada con el grado de diferenciación de las células tumorales. En acorde con nuestros resultados deciden que una fuerte expresión de *HSP 70* no es esencial para el fenotipo transformado o diferenciado. **(152).*

Por otra parte la proteína de estrés de 27kD ha sido analizada inmunohistoquímicamente en relación con el grado de diferenciación tumoral en algunos tumores de diferente origen tisular. La inmunopositividad de *HSP 27* incrementa en proporción con la anaplasia de una larga serie de tumores cerebrales. **(362).* Sin embargo, la incompatibilidad de resultados se hace patente en la comparación de nuestros datos con los de otros prestigiosos autores. Y es que son muchos los estudios que han detectado una relación inversa entre la positividad para el antígeno y la gradación según la cual se clasificó una serie de carcinomas de mama, tumores prostáticos, neoplasias uterinas, carcinomas hepatocelulares y sarcomas. **(100,153,156,157,198,270,278,279,295,349).* En tanto y en cuanto los tumores bien diferenciados generalmente tienen un mejor pronóstico resulta lógico el hecho de que niveles elevados de *HSP 27* se correspondan con un pronóstico favorable en algunos tumores. De este modo su análisis en pulmón surge en desacuerdo a tales opiniones aunque en acorde con aquellas otras que describen a la misma proteína de estrés en las neoplasias con menores expectativas de vida. **(171,197,205,350,351,353).*

Otros estudios simplemente no apoyan la participación de las *HSP's* como indicadores de la diferenciación neoplásica. Es el caso *Vargas SO.* quien no halla correlación alguna entre la proteína *p29* y el grado de diferenciación tumoral en

que se clasificó una serie de carcinomas broncopulmonares de células no pequeñas. ^{*(303)}. El equipo de *Storm FK*. tampoco encuentra ninguna asociación entre la proteína de bajo peso molecular y la diferenciación neoplásica en el carcinoma de vejiga. ^{*(355)}.

Por otra parte son varias las hipótesis que podrían justificar de una manera coherente los datos obtenidos en nuestro estudio. En ocasiones previas nos hemos hecho eco de algunos trabajos que consideraban a las *HSP's* necesarias en los fenómenos de división y proliferación celular. Nuestros resultados dan apoyo a tales planteamientos desde que hemos descrito una menor expresión de proteínas de estrés precisamente en las neoplasias de bajo grado y con menor actividad proliferativa.

Nuevas teorías podrían explicar la falta de expresión de *HSP's* en los tumores de bajo grado. La alta tasa de división celular a la que generalmente están sometidas las neoplasias menos diferenciadas puede ser responsable de una rápida acumulación de proteínas desnaturalizadas. Las probabilidades de mutación se agravarían en los tumores de alto grado dando lugar a errores de plegamiento proteico. En tal situación no resultaría de extrañar una extensa localización de proteínas de estrés en donde podrían ejercer como acompañantes moleculares de las proteínas desnaturalizadas con el fin de restablecer la “normalidad” celular.

En un intento de descifrar si verdaderamente existe algún tipo de conexión que vincule la manifestación de antígenos de estrés junto al pronóstico de los tumores broncopulmonares valoramos si la expresión proteica se ajusta a determinados estadios neoplásicos.

El grado de estadificación tumoral surge como un reconocido factor pronóstico a partir del valor *TNM* adjudicado a cada neoplasia lo que implica la consideración previa de algunos datos evaluados inicialmente tales como el diámetro tumoral y la afectación ganglionar. La descripción de metástasis a distancia también es un factor a tener en cuenta para el estadiaje de carcinomas broncopulmonares aunque su presencia clasifica siempre a las neoplasias dentro de un estadio IV. ^{*(250)}.

En la valoración de nuestros resultados manifestamos que la falta de expresión de la proteína de 70kD parece asociarse con los estadijes más avanzados ($p>0.05$). Por su parte la falta de expresión de la proteína de 27kD pudiera estar relacionada con los estadijes menos avanzados ($p>0.05$).

El Sistema Internacional de *TNM* para la Estadificación del Cáncer de Pulmón establece a grandes rasgos que los tumores de mayor tamaño y con metástasis ganglionares se corresponden con los estadios más avanzados y viceversa. ^{*(250)}. Siguiendo tal consideración resulta lógico hallar la proteína de estrés de 70kD mayormente localizada en los tumores broncopulmonares de bajo grado de estadificación en tanto y en cuanto previamente quedó descrita una mayor expresión proteica en los tumores más pequeños y sin diseminación ganglionar. En acuerdo a tales pesquisas la falta de expresión de la proteína *HSP 27* parece estar vinculada a los tumores con menor diámetro, sin afectación ganglionar y de estadiaje menos avanzado.

La consideración conjunta del tamaño tumoral, la afectación ganglionar y el estadiaje neoplásico como importantes factores pronósticos en la evolución del cáncer pulmonar nos lleva a concluir que la falta de expresión de la proteína de

70kD pudiera asociarse con las etapas más tardías en la evolución de las neoplasias broncopulmonares dado que su negatividad aumenta en los tumores de mayor diámetro, con afectación ganglionar y estadiaje más avanzado. Por el contrario la falta de expresión de la proteína de 27kD parece asociarse con las etapas más tempranas en la evolución de las mismas neoplasias dado que su negatividad aumenta en los tumores de menor diámetro, sin afectación ganglionar y estadiaje menos avanzado.

El equipo de *Vargas SO.* describe en desacuerdo con nuestros datos que los individuos con carcinomas pulmonares de estadiaje IIIb tienen una positividad antigénica para *p29* significativamente más baja en comparación con los sujetos agrupados en otros estadiajes. ^{*(303)}. De un modo similar el grupo de *Geisler JP.* demostró que los niveles de expresión definidos para la proteína de bajo peso molecular incrementaban en los estadiajes menos avanzados correspondientes a una serie de carcinomas endometriales. ^{*(349)}. Sin embargo, no siempre ha sido posible demostrar algún tipo de relación que haga a la proteína de estrés dependiente del grado de estadificación tumoral. La expresión de *HSP 27* no se correlaciona con el estadiaje en que se catalogó a un conjunto de carcinomas de vejiga. ^{*(355)}.

Hasta aquí hemos evaluado la expresión de determinadas proteínas de choque térmico en función de algunos parámetros histoanatomopatológicos considerados de gran utilidad en la obtención de un pronóstico acertado de la enfermedad broncopulmonar. No obstante, la supervivencia constituye un importante factor a considerar en tanto que evalúa las consecuencias últimas en la evolución del tumor. Por ello y ante la falta de estudios previos hemos creído de interés evaluar

como parte final de nuestro trabajo la expresión de *HSP's* en dependencia del estado de supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer pulmonar.

En acorde con las cifras de supervivencia mundial descritas para el cáncer de pulmón nuestros resultados se hacen eco de la elevada tasa de mortalidad que afecta a los pacientes diagnosticados con tal enfermedad. Y es que el 44.4% de los individuos considerados en el desarrollo de nuestra tesis murió a consecuencia del tumor. Por su parte el 40% de los casos analizados han permanecido vivos tras un amplio intervalo de seguimiento a pesar de que el 19.4% de los pacientes vivos manifestaron recidivas que sin duda pueden evolucionar hacia un estado de consecuencias fatales.

El análisis de la supervivencia en relación con la proteína de estrés de elevado peso molecular revela la existencia de cierta dependencia entre ambos factores. La falta de expresión antigénica parece asociarse con una menor supervivencia ($p>0.05$).

Por su parte la proteína de 27kD es expresada en carcinomas epidermoides sin verse en principio influenciada por la supervivencia de los pacientes. No obstante y al menos en adenocarcinomas la falta de expresión de la proteína *HSP 27* parece estar asociada a una menor supervivencia ($p>0.05$).

El equipo de *Vargas SO.* describe que la supervivencia a los 10 años no se relaciona con la expresión antigénica de *p29* en un amplio conjunto de carcinomas broncopulmonares de células no pequeñas. No obstante, la dependencia entre ambos factores quedó establecida de manera significativa al considerar exclusivamente las mujeres integrantes de tal serie tumoral. Así las

pacientes con elevada expresión de *p29* mostraban relación con un pronóstico pobre. Por otra parte y entre los hombres la misma expresión proteica parecía asociarse directamente con la supervivencia aunque la relación no fue significativa desde el punto de vista estadístico. Los efectos estrogénicos fueron involucrados para explicar las diferencias genéricas halladas. El grupo de *Vargas SO.* expone que posiblemente la relación entre la expresión de *p29* y el comportamiento del carcinoma broncopulmonar observada entre las mujeres sea función de la interacción dependiente de estrógenos de la proteína con los receptores hormonales. **(303).*

Algunos estudios preliminares han intentado descifrar si ciertamente la expresión de proteínas de estrés es función del estado de supervivencia de pacientes con tumores de diferente origen tisular.

Los grupos de *Thor A.* y *Love S.* han descrito independientemente al antígeno *HSP 27* como un marcador pronóstico en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama al notar que su expresión se correlacionaba con periodos cortos libres de enfermedad. **(197,363).* Por su parte *Oesterreich S.* halló resultados similares aunque tan solo en un subgrupo de mujeres previamente no tratadas y positivas para el receptor de estrógenos. **(360).* En el carcinoma endometrial la proteína de 27 kD ha sido correlacionada con pacientes recurrentes y pacientes que murieron a consecuencia del tumor. **(349).*

No obstante, el grupo de *Elledge RM.* defiende que el antígeno *HSP 70* caracteriza a un conjunto de pacientes de cáncer de mama negativos para *p53* como individuos con un mayor índice de supervivencia. **(207).*

Por su parte otros trabajos no encuentran ningún tipo de asociación que vincule a la proteína de bajo peso molecular con términos de supervivencia. En el carcinoma de vejiga no quedó descrita tal subordinación. ^{*(355)}.

Quizás, la modulación de los niveles de expresión de las proteínas de estrés consideradas en este trabajo sea ciertamente un suceso relacionado con la evolución de los pacientes. Sin embargo, no parece ser un hecho aplicable a todos los tejidos ni a todas las circunstancias. Probablemente, la expresión de proteínas de choque térmico es función de la supervivencia tan solo en algunas neoplasias sometidas a concretas situaciones, mientras que bajo otras circunstancias simplemente no exista tal correlación.

V.-RESUMEN Y
CONCLUSIONES

V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

5.1.-RESUMEN:

El cáncer de pulmón es la neoplasia con mayor índice de mortalidad en los países industrializados. La etiología de la enfermedad se asocia a factores ambientales y genéticos. Aunque los programas de educación pública intentan en la medida de lo posible combatir la elevada incidencia de la enfermedad, a la vez que los nuevos avances terapéuticos luchan por obtener palpables mejoras en la evolución de los pacientes, el cáncer de pulmón sigue mostrando una tasa de mortalidad desorbitada y por este motivo sigue siendo una de las neoplasias más desafiantes para el campo de la Medicina.

El pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón constituye una indiscutible meta de estudio sobretodo desde la identificación de importantes factores que de alguna manera ayudan a predecir el comportamiento evolutivo del tumor.

Junto a los parámetros histoanatomopatológicos convencionales (tamaño del tumor, afectación ganglionar, tipo histológico, grado de diferenciación y estadiaje) como útiles herramientas en la caracterización de un tumor se abren nuevas vías de investigación que envuelven a un amplio conjunto de marcadores biológicos. Algunos son antígenos sumamente probados y otros se perfilan como

promesas pero que en cualquier caso están contribuyendo al conocimiento de la biología tumoral y aumentando las expectativas de las personas que padecen tal enfermedad.

Nuestras perspectivas están puestas en la posible implicación biológica y pronóstica que determinadas proteínas de estrés objeto de nuestro estudio puedan ejercer en el cáncer de pulmón.

La respuesta de estrés se concibe como un mecanismo de defensa natural definido por una específica expresión de proteínas de choque térmico que median la invulnerabilidad y protección frente a diversas formas de daño celular. Su extensa distribución sobre tejidos patológicos en general y neoplásicos en particular, bajo la sospecha del papel auxiliar que pudieran ejercer ante tales situaciones de desorden, hace necesaria la puesta en marcha de nuevos trabajos que amplíen las escasas informaciones existentes al respecto.

En este trabajo hemos estudiado la expresión de las proteínas de choque térmico *HSP 70* y *HSP 27* en un total de 90 tumores broncopulmonares y su relación con parámetros histoanatomopatológicos de probado interés pronóstico en este tipo de neoplasias. Asimismo, hemos determinado su asociación con los estados de supervivencia estimados.

Consideramos igualmente interesante el estudio de las mismas proteínas de estrés en los tejidos pulmonares normales con la seguridad de que contribuirá a un mejor entendimiento a cerca de algunas de las funciones biológicas en las que se les ha implicado hasta el momento.

Los datos obtenidos confirman la mayor frecuencia, extensión e intensidad de expresión de tales proteínas de choque térmico entre las neoplasias broncopulmonares en comparación con las estructuras normales.

En cuanto a los resultados obtenidos para la expresión de las dos proteínas de estrés que nos interesan (*HSP 70* y *HSP 27*) en los tejidos normales corroboramos su localización selectiva en tan solo determinadas estirpes celulares propias de la arquitectura broncopulmonar. Al mismo tiempo, revelamos que aunque ambas proteínas restringen su expresión a similares estructuras normales (a excepción de su localización complementaria descrita en el epitelio bronquial) la proteína de elevado peso molecular es demostrada con mayor frecuencia, extensión e intensidad en comparación con la forma más pequeña.

Por lo que respecta a la expresión de *HSP's* en tumores esta ha sido calificada como heterogénea. Las diferencias halladas han sido determinadas entre neoplasias. Además, detectamos la presencia de campos tumorales con microheterogeneidad de expresión. Asimismo, la inmunolocalización en tumores de la proteína de bajo peso molecular es menor en frecuencia y extensión en comparación con el marcaje que distingue a *HSP 70*.

Como parte fundamental de este trabajo las proteínas de estrés consideradas han sido asociadas con determinadas variables pronósticas aplicadas habitualmente con el fin de conformar el comportamiento evolutivo que pudieran sufrir las neoplasias broncopulmonares.

De este modo, la falta de expresión de la forma proteica de alto peso molecular se asocia con los estados más tardíos en la evolución de las neoplasias broncopulmonares. Su negatividad aumenta en las neoplasias con mayor tamaño, afectación ganglionar, estadiaje más avanzado y menor supervivencia.

Por su parte, la falta de expresión correspondiente a la proteína *HSP 27* se asocia con las etapas más tempranas en la evolución de neoplasias broncopulmonares dado que su negatividad es mayor en los tumores con menor diámetro, sin afectación ganglionar y estadiaje menos avanzado. Al menos en adenocarcinomas la falta de expresión de *HSP 27* se asocia con una menor supervivencia.

Asimismo, la expresión de *HSP's* (*HSP 70* y *HSP 27*) se asocia con el grado histológico de diferenciación tumoral. Su falta de expresión en neoplasias de grado bajo quizás lleve a relacionarlas con neoplasias pobremente diferenciadas, generalmente más agresivas y que en definitiva ofrecen peores expectativas.

Por otra parte, la inmunolocalización de *HSP's* ha quedado asociada con específicos tipos tumorales. La elevada expresión de *HSP 70* se asocia con los tipos neoplásicos más agresivos (carcinomas indiferenciados de células grandes y carcinomas indiferenciados de células pequeñas). Mientras, la proteína *HSP 27* sufre pérdidas de expresión en tales grupos.

Por consiguiente, las proteínas de estrés parecen expresarse en función de determinados parámetros descriptivos del comportamiento evolutivo de los tumores broncopulmonares. Tal hecho podría constituir el inicio en la consideración de las *HSP's* como colaboradores pronósticos. Sin embargo,

creemos necesaria la apertura de nuevas líneas de investigación encaminadas a establecer definitivamente el papel que las proteínas de estrés pudieran ejercer en tales neoplasias.

5.2.-CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo y los datos aportados por el estudio estadístico realizado nos permite concluir que:

1. Las proteínas de choque térmico *HSP 70* y *HSP 27* son selectivamente localizadas en determinadas estructuras normales de la arquitectura broncopulmonar. Su expresión es complementaria en las vías aéreas cartilagosas. La proteína *HSP 70* se expresa en el epitelio ciliado bronquial mientras que *HSP 27* se localiza en las células basales contiguas. Las ubicaciones comunes son el epitelio no mucosecretor de las vías aéreas finas, las células ductales de las glándulas submucosas, el músculo bronquial y los neumocitos tipo II. Ninguna de las dos proteínas de estrés se expresa en células caliciformes ni glándulas submucosas. Si bien *HSP 70* se expresa en estructuras normales con mayor frecuencia, extensión e intensidad que *HSP 27*.
2. El inmunomarcaje hallado difiere entre tejidos tumorales y normales. Los tejidos neoplásicos exhiben ambas proteínas de estrés (*HSP 70* y *HSP 27*) con mayor frecuencia, extensión e intensidad que cada una de las estructuras normales centrales y periféricas consideradas como objeto de estudio en este trabajo.

3. La distribución de *HSP's* en tumores es heterogénea. Las diferencias halladas han sido identificadas entre neoplasias. Asimismo detectamos la presencia de campos tumorales con microheterogeneidad de expresión. Si bien *HSP 70* se expresa en tumores con mayor frecuencia y extensión que *HSP 27*.
4. La falta de expresión de la proteína de 70kD parece asociarse con las etapas más tardías en la evolución de las neoplasias dado que su negatividad aumenta en los tumores con mayor diámetro, afectación ganglionar, estadiaje más avanzado y menor supervivencia ($p>0.05$).
5. La falta de expresión de la proteína de 27kD parece asociarse con las etapas más tempranas en la evolución de las neoplasias dado que su negatividad aumenta en los tumores con menor diámetro, sin afectación ganglionar y estadiaje menos avanzado ($p>0.05$). Al menos en adenocarcinomas la falta de expresión de *HSP 27* parece asociarse con una menor supervivencia ($p>0.05$).
6. La falta de expresión de *HSP 70* y *HSP 27* parece asociarse con grados histológicos bajos correspondientes a neoplasias bien diferenciadas ($p>0.05$).
7. La expresión de *HSP 70* parece asociarse a las neoplasias más agresivas (carcinomas indiferenciados de células grandes y carcinomas indiferenciados de células pequeñas) ($p>0.05$).
8. La falta de expresión de *HSP 27* se asocia significativamente a las neoplasias más agresivas (carcinomas indiferenciados de células grandes y carcinomas indiferenciados de células pequeñas) ($p<0.05$).

Por consiguiente, y resumiendo los puntos anteriores, este trabajo demuestra que la expresión de proteínas de choque térmico en tejidos broncopulmonares normales es un fenómeno restringido a determinadas estructuras (epitelio ciliado y basal de vías aéreas gruesas, epitelio no mucosecretor de vías aéreas finas, músculo bronquial, células ductales y neumocitos tipo II). Por otra parte, la expresión de proteínas de choque térmico parece asociarse a ciertos rasgos del comportamiento evolutivo del tumor. La proteína *HSP 70* sufre pérdidas de expresión en las etapas más tardías de la evolución de las neoplasias broncopulmonares. Mientras, la proteína *HSP 27* pierde expresión en las etapas más tempranas. El aumento de expresión de proteínas de choque térmico se asocia con una mayor supervivencia. Su expresión se ve reducida en los tumores bien diferenciados. Y por último, la expresión elevada de *HSP 70* se asocia con las neoplasias más agresivas a la vez que *HSP 27* pierde expresión en las mismas.

VI.-BIBLIOGRAFÍA

VI.-BIBLIOGRAFÍA

1. Moller JO, Esteve j, Moller H, Renard H. **Cancer in European Community and its member states.** *Eur J Cancer* 26:1167-1256, 1990.
2. Takkouche B y Gestal-Otero JJ. **The epidemiology of lung cancer: Review of risk factors and Spanish data.** *Eur J Epidemiol* 12:341-349, 1996.
3. Mandel JS y Oken M. **Etiology, prevention, and treatment of breast, prostate, colorectal and lung cancer.** *Minn Med* 81:44-46, 1998.
4. Shields PG. **Epidemiology of tobacco carcinogenesis.** *Curr Oncol Rep* 2:257-262, 2000.
5. Fabian MC, Irish JC, Brown DH, Liu TC y Gullane PJ. **Tobacco, alcohol and oral cancer: The patient's perspective.** *J Otolaryngol* 25:88-93, 1996.
6. Wei Q y Spitz MR. **The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: A review.** *Cancer Metastasis Rev* 16:295-307, 1997.
7. Aleksandrovic J y Jeremic B. **Modern diagnostic and therapeutic methods in bronchiolo-alveolar carcinoma.** *Srp Arh Celok Lek* 125:356-362, 1997.
8. Fidanza L, Franco G, Malamani T y Moscato G. **Passive smoking: A risk factor in the home environment.** *G Ital Med Lav* 8:233-240, 1986.
9. Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P y col. **Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household.** *N Engl J Med* 323:632-636, 1990.
10. Fonham ET, Correa P y Chen VW. **Passive smoking and lung cancer.** *J La State Med Soc* 145:132-136, 1993.
11. Law MR y Hackshaw AK. **Enviromental tobacco smoke.** *Br Med Bull* 52:22-34, 1996.
12. Hackshaw AK. **Lung cancer and passive smoking.** *Stat Methods Med Res* 7:119-136, 1998.
13. Nilsson R. **Environmental tobacco smoke and lung cancer: A reappraisal.** *Ecotoxicol Environ Saf* 34:2-17, 1996.
14. Dave BJ, Hopwood VL, King TM, Jiang H y col. **Genetic susceptibility to lung cancer as determined by lymphocytic chromosome analysis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:743-749, 1995.

15. DU YX, Zhou BS y Wu JM. **Lifestyle factors and human lung cancer: An overview of recent advances (Review).** *Int J Oncol* 13:471-479, 1998.
16. Miyake M, Adachi M, Huang C, Higashiyama M y col. **A novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer.** *Oncogene* 18:2397-2404, 1999.
17. Keohavong P, DeMichele MA, Melacrinis AC, Landreneau RJ y col. **Detection of k-Ras mutations in lung carcinomas: Relationship to prognosis.** *Clin Cancer Res* 2:411-418, 1996.
18. Seemayer TA y Cavenee WE. **Biology of disease: Molecular mechanisms of oncogenesis.** *Lab Invest* 60:585-599, 1989.
19. Yokota J, Wada M, Shimosato Y y col. **Loss of heterozygosity of chromosomes 3, 13 and 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung.** *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9252-9256, 1987.
20. Levine AJ. **Tumor supressor genes.** *Bioassays* 12:60-66, 1990.
21. Hollingsworth RE y Lee W-H. **Tumor supressor genes: New prospect for cancer research.** *J Natl Cancer Inst* 83:91-96, 1991.
22. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B y Harris CC. **P53 mutations in human cancers.** *Science* 253:49-53, 1991.
23. Raycroft L, Wu HY y Lozano G. **Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene.** *Science* 249:1049-1051, 1990.
24. Fields d y Jang SK. **Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein.** *Science* 249:1046-1049, 1990.
25. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA y col. **P53 mutations, ras mutations and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines.** *Cancer Res* 51:4090-4096, 1991.
26. Takahasi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ y col. **P53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer.** *Science* 246:491-494, 1989.
27. Sugio K, Sakada T, Saito G, Maruyama R y col. **Extended resection of the pulmonary artery and the aorta for the primary lung cancer. Report of a case.** *J Cardiovasc Surg* 40:749-751, 1999.
28. Martini N, Rusch VW, Bains MS, Kris MG y col. **Factor influencing ten-year in resected stages I to IIIa non-small cell lung cancer.** *J Thrac Cardiovasc Surg* 117:32-36, 1999.
29. Wertzel H, Siebert H, lange W, Swoboda L y col. **Results after surgery in stage-I bronchogenic carcinoma.** *Thrac Cardiovasc Surg* 46:365-369, 1998.
30. Lee JH, Machtay M, Kaiser LR, Friedberg JS y col. **Non-small cell lung cancer: Prognostic factors**

in patients treated with surgery and postoperative radiation therapy. Radiology 213:845-852, 1999.

31. Prak JH, Shim YM, Baek HJ, Kim MS y col. **Postoperative adyuvant therapy for stage II non-small-cell lung cancer. Ann Thorac Surg 68:1821-1826, 1999.**

32. Lassen U y Hasen HH. **Surgery in limited stage small cell lung cancer. Cancer Treat Rev 25:67-72, 1999.**

33. Hill AA, Wan F, Acheson DK y Skarsgard LD. **Lack of correlation between G1 arrest and radiation age-response in three synchronized human tumour cell lines. Int J Radiant Biol 75:1395-1408, 1999.**

34. Nguyen LN, Komaki R, Allen P, Schea RA y Milas L. **Effectiveness of accelerated radiotherapy for patients with inoperable non-small cell lung cancer (NSCLC) and borderline prognostic factors without distant metastasis: A retrospective review. Int J Oncol Biol Phys 44:1053-1056, 1999.**

35. Donato V, Zurlo A, Bonfili P, Petrongari M y col. **Hypofractionate radiation therapy for inoperable advanced stage non-small cell lung cancer. Tumori 85:174-176, 1999.**

36. Ornstein DL, Nervi AM y Rigas JR. **Docetaxel (taxotere) in combination chemotherapy and in association with thoracic radiotherapy for the treatment of non-small-cell lung cancer. Thoracic Oncol Program. Ann Oncol 10:35-40, 1999.**

37. Eberhardt W, Stamatis G, Stuschke M, Wilke H y col. **Prognostically orientated multimodality treatment including surgery for selected patients of small-cell lung cancer patients stages IB to IIIB: Long-term results of a phase II trial. Br J Cancer 81:1206-1212, 1999.**

38. Drewinko B, Patchen M, Yang L-Y y Barlogie B. **Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells. Cancer Res 41:2328-2333, 1981.**

39. Trott KR. **Chemoradiotherapy interactions and lung toxicity. Ann Oncol 10:77-81, 1999.**

40. Fossella FV. **Docetaxel in the treatment of non-small cell lung cancer: Review of single-agent triasl. Semin Oncol 26:17-23, 1999.**

41. Wozniac AJ. **Single-agent vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer. Semin Oncol 26:62-66, 1999.**

42. Adjei AA, Argiris A y Murren JR. **Docetaxol and irinotecal, alone and in combination, in the treatment of the non-small cell lung cancer. Semin Oncol 26:32-40, 1999.**

43. Herbst RS y Lilenbaum R. **Gemcitabine and vinorelbine combinations in the treatment of non-small cell lung cancer. Semin Oncol 26:67-70, 1999.**

44. Ng EW, Sandler AB, Robinson L y Einhom LH. **A phase II study of carboplatin plus gemcitabine in advances non-small cell lung cancer (NSCLC): A hoosier oncology group study. Am J Clin Oncol**

22:550-553, 1999.

45. Recchia F, De Filippis S, Pompili PL, Roselli M y col. **Carboplatin, vindesine, 5-fluorouracil-leucovorin and 13-cis retinoic acid in the treatment of the advanced non-small cell lung cancer. A phase II study.** *Clin Ter* 150:269-274, 1999.

46. Herndon JE 2nd, Fleishman S, Komblith AB, Kosty M y col. **Is quality of life predictive of the survival of patients with advanced non-small cell lung carcinoma?.** *Cancer* 85:233-240, 1999.

47. Martins SJ y Pereira JR. **Clinical factors and prognosis in non-small cell lung cancer.** *Am J Clin Oncol* 22:453-457, 1999.

48. Jara C, Gomez-Aldaravi JL, Tirado R, Meseguer VA y col. **Small-cell lung cancer in the elderly--is age of patient a relevant factor?.** *Acta Oncol* 38:781-786, 1999.

49. Gould PM, Bonner JA, Sawyer TE, Deschamps C y col. **Patterns of failure and overall survival in patients with completely resected T3 N0 M0 non-small cell lung cancer.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45:91-95, 1999.

50. Lassen UN, Osterlind K, Hirsch FR, Bergman B y col. **Early death during chemotherapy in patients with small cell lung cancer: Derivation of a prognostic index for toxic death and progression.** *Br J Cancer* 79:515-519, 1999.

51. Bouchardy C, Fioretti G, De Perrot m, Obradovic M y col. **Determinants of long term survival after surgery for cancer of the lung: A population-based study.** *Cancer* 86:2229-2237, 1999.

52. Yoshino I, Nakanishi R, Osaki T, Takenoyama M y col. **Unfavorable prognosis of patients with stage II non-small cell lung cancer associated with macroscopic nodal metastases.** *Chest* 116:144-149, 1999.

53. Fu XL, Zhu XZ, Shi DR, Xiu LZ y col. **Study of prognostic predictors for non-small cell lung cancer.** *Lung Cancer* 23:143-152, 1999.

54. Suzuki K, Nagai K, Yoshida J, Moriyama E y col. **Prognostic factors in clinical stage I non-small cell lung cancer.** *Ann Thorac Surg* 67:927-932, 1999.

55. Suzuki K, Nagai K, Yoshida J, Nishimura N y col. **The prognosis of surgically resected N2 non-small cell lung cancer: The importance of clinical status.** *Thorac Cardiovasc Surg* 118:145-153, 1999.

56. Sawyer TE, Bonner JA, Gould PM, Foote RL y col. **Factors predicting patterns of recurrence after resection of N1 non-small cell lung carcinoma.** *Ann Thorac Surg* 68:1171-1176, 1999.

57. Kubuschok B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O y Pantel K. **Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 17:19-24, 1999.

-
-
58. Ando M, Ando Y, Sugiura S, Minami H y col. **Prognostic factors for short-term survival in patients with stage IV non-small cell lung cancer.** *Jpn J Cancer Res* 90:249-253, 1999.
59. D'Amico TA, Massey M, Herndon JE 2nd, Moore MB y col. **A biologic risk model for stage I lung cancer: Immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers.** *J Thrac Cardiovasc Surg* 117:736-743, 1999.
60. Lavezzi AM, Santambrogio L, Bellaviti N, Biondo B y col. **Prognostic significance of different biomarkers in non-small cell lung cancer.** *Oncol Rep* 6:819-825, 1999.
61. Volm M, Efferth T, Mattern J y Wodrich W. **Overexpression of c-fos and c-erbB1 encoded proteins in squamous cell carcinomas of the lung of smokers.** *Int J Oncol* 1:69-71, 1992.
62. Hanahan D y Weinberg RA. **The Hallmarks of cancer. Review.** *Cell* 100:57-70, 2000.
63. Travis WD, Colby TV, Corrin B y col. **Histological typing of tumours of lung and pleura.** Sobin LH Ed. *World Health Organization international classification of tumours.* 3rd Ed. Berlin. Germany. Springer-Verlag. 1999.
64. Schlesinger MJ. **Heat shock proteins.** *J Biol Chem* 265:12111-12114, 1990.
65. Lindquist S y Craig EA. **The heat-shock proteins.** *Annu Rev Genet* 22:631-677, 1988.
66. Carper SW, Duffy JJ y Gerner EW. **Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes.** *Cancer Research* 47:5249-5255, 1987.
67. Morimoto RI. **Heat shock: The role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation.** *Cancer Cells* 3:295-301, 1991.
68. Arrigo AP, Pauli D, Fabre N y col. **Expression and localization of the small hsps made in absence of heat shock in Drosophila and mammalian cells.** *Stress Proteins and the Heat Shock Response* 71. Eds. R Morimoto, C Georgopoulos. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. 1991.
69. Beckman RP, Mizzen LE y Welch WJ. **Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins; implications for protein folding and assembly.** *Science* 248:850-854, 1990.
70. Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL y col. **Identity of the 19S "prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasoma).** *Nature* 331:192-194, 1988.
71. Rothman JE. **Polypeptide chain binding proteins: Catalysts of protein folding and related processes in cells.** *Cell* 59:591-601, 1989.
72. Gething MJ y Sambrook J. **Protein folding in the cell.** *Nature* 355:33-45, 1992.
73. Deshaies RJ, Koch BD, Wernwr-Washburner M, Craig EA y col. **A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides.** *Nature* 332:800-805,

1988.

74. Chirico WJ, Waters MG y Blobel G. **70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes.** *Nature* 332:805-810, 1988.
75. Ungewickell E. **The 70-Kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles.** *EMBO J* 4:3385-3391, 1985.
76. Beckmann RP, Lovett M y Welch WJ. **Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress.** *J Cell Biol* 117:1137-1150, 1992.
77. Ritossa FM. **A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in Drosophila.** *Experientia* 18:571-573, 1962.
78. Burdon RH. **Heat shock and the heat shock proteins.** *Biochem J* 240:313-324, 1986.
79. Lindquist SC. **The heat shock response.** *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191, 1986.
80. Minowada G y Welch WJ. **Clinical implications of the stress response.** *J Clin Invest* 95:3-12, 1995.
81. Ciocca Dr, Fuqua SAW, Lock-Lim S, Toft DO y col. **Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs.** *Cancer Res* 52:3648-3654, 1992.
82. Aucoin MM, Barhoumi R, Kochevar DT, Granger HJ y col. **Oxidative injury of coronary endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces HSP 70 mRNA.** *Am J Physiol* 268:1651-1658, 1995.
83. Jornot L, Mirault ME y Junod AF. **Differential expression of hsp70 stress proteins in human endothelial cells exposed to heat shock and hydrogen peroxide.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:265-275, 1991.
84. Bielka H, Hoinkis G, Oesterreich S, Stahl J y Benndorf R. **Induction of the small stress protein, hsp25, in Ehrlich ascites carcinoma cells by anticancer drugs.** *FENS Lett* 343:165-167, 1994.
85. Levinson W, Opperman H y Jackson J. **Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells.** *Biochem Biophys Acta* 60:170-180, 1980.
86. Li G. **Induction of thermotolerance and enhance heat shock proteins synthesis in Chinese hamster fibroblasts by arsenite and by ethanol.** *J Cell Physiol* 115:116-119, 1983.
87. Zatlowlak K, Sohar R, Lackinger E, Denk H. **Induction of heat shock proteins in short-term cultured hepatocytes derived from normal and chronically griseofulvin-treated mice.** *Hepatology* 8:607-612, 1988.
88. Wong CG, Bonakdar M, Mautz WJ, Kleainman MT. **Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein HSP 70 in the rat lung.** *Toxicology* 107:111-119, 1996.

89. Joslin G, Hafeez W y Perlmutter DH. **Expression of stress proteins in human mononuclear phagocytes.** *J Immunol* 147:1614-1620, 1991.
90. Omar R, Pappolla M y Saran B. **Immunohistochemical detection of the 70-kd heat shock protein in alcoholic liver disease.** *Arch Pathol Lab Med* 114:589-592, 1990.
91. Milarski KL, Welch WJ y Morimoto RI. **Cell Cycle-dependent association of HSP70 with specific cellular proteins.** *The Journal of Cell Biology* 108:413-423, 1989.
92. Strand C, Warshaw JB, Snow K y Jacobs HC. **Heat shock does not induce tolerance to hyperoxia.** *Lung* 172:79-89, 1994.
93. Fuqua SAW, Blum-Salingaros M y McGuire WL. **Induction of the estrogen-regulated "24K" protein by heat shock.** *Cancer Res* 49:4126-4129, 1989.
94. Nevins JR. **Induction of the synthesis of 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product.** *Cell* 29:913-919, 1982.
95. Deitch EA, Beck SC, Cruz NC y De Maio A. **Induction of heat shock gene expression in colonic epithelial cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin.** *Crit Care Med*, 23:1371-1376, 1995.
96. Ciocca DR, Lo Castro G, Alonio LV y col. **Effect of human papillomavirus infection on estrogen receptor and heat shock protein p27 phenotype in human cervix and vagina.** *Int J Gynecol Pathol* 11:113-121, 1992.
97. Milarski KL y Morimoto RI. **Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle.** *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9517-9521, 1986.
98. Omar R y Lanks K. **Heat shock protein synthesis and cell survival in clones of normal and SV40-transformed mouse embryo cells.** *Cancer Res* 44:3967-3982, 1984.
99. Ciandra J, Subjeck J y Hughes C. **Induction of glucose-related proteins during anaerobic exposure and heat shock-proteins after reoxygenation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4843-4847, 1984.
100. McGuire WL, Dressler LG, Sledge GW, Ramzy I y Ciocca DR. **An estrogen-regulated protein in normal and malignant endometrium.** *J Steroid Biochem* 1:155-159, 1986.
101. Mehta NK, Carroll M, Sykes DE, Tan Z y col. **Heat shock protein 70 expression in native and heterotopically transplanted rat hearts.** *Journal of Surgical Research* 70:151-155, 1997.
102. Ananthan J, Goldberg AL y Voellmy R. **Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signal and trigger the activation of heat shock genes.** *Science* 232:522-524, 1986.
103. Omar R, Yano S y Kikkawa Y. **Antioxidant enzymes and survival of normal and SV40-transformed**

- mouse embryo cells after hyperthermia. Cancer Res 47:3473-3476, 1987.*
104. Shaw S, Jayatilleke E y Lieber C. **Increased microsomal lipid peroxidation after cronic alcohol consumption: Role of microsomal inductions and centrilobular necrosis.** *Hepatology 5:1029-1035, 1985.*
105. Jäättelä M y Wissing D. **Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: Possible mechanims of self-protection.** *J Exp Med 177:231-236, 1993.*
106. Brown IR y Rush SJ. **Induction of a "stress" proteins in intact mammalian organs after the intravenous administration of sodium arsenite.** *Biochem Biophys Res Commun 120:150-155, 1984.*
107. Ellis J. **Proteins as molecular chaperones.** *Nature 328:378-379, 1987.*
108. Jakob U, Gaestel M, Engel K y col. **Small heat shock proteins are molecular chaperones.** *J Biol Chem 268:1517-1520, 1993.*
109. Lin CY, Roberts JK y Key JL. **Adquisition of thermotolerance in soybean seedlings synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization.** *Plant physiol 74:152-160, 1984.*
110. Lindquist S. **Varying patters of protein synthesis in Drosophila during heat shock: Implications for regulation.** *Dev Biol 77:463-479, 1980.*
111. Sciandra JJ y Subjeck JR. **Heat shock proteins and protection of proliferation and translation in mammalian cells.** *Cancer Res 44.5188-5194, 1984.*
112. Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM y Landry J. **Induction of chinese hamster hsp 27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock.** *J Biol Chem 268:3420-3429, 1993.*
113. Welch WJ. **Mammalian stress response: Cell physiology structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease.** *Physiol Rev 72:1063-1081, 1992.*
114. Riabowol KT, Mizzen LA y Welch WJ. **Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP70.** *Science 242:433-436, 1988.*
115. Mizzen LA y Welch WJ. **Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression.** *The Journal of Cell Biology 106:1105-1116, 1988.*
116. Gerner EW y Schneider MJ. **Induced thermal tolerance in HeLa cells.** *Nature 256:500-502, 1975.*
117. Li GC y Werb Z. **Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblast.** *Proc Natl Acad Sci USA 89:3218-3222, 1982.*
118. Landry J, Chrétien P, Lambert H y col. **Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP 27 gene in rodent cells.** *J Cell Biol 109:7-15, 1989.*

119. Hendrey J y Kola I. **Thermolability of mouse oocytes is due to the lack of expression and/or inducibility of HSP 70.** *Mol Reprod Dev* 28:1-8, 1991.
120. Li GC, Li L, Liu YK, Mak JY y col. **Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with human 70-kD heat shock protein-encode gene.** *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2036-2040, 1992.
121. Johnston RJ y Kucey BL. **Competitive inhibition of HSP70 gene expression causes thermosensitivity.** *Science* 242:1551-1554, 1988.
122. Henle KJ y Leeper DB. **Modification of the heat response and thermotolerance by cycloheximide, hydroxyurea and lucanthone in CHO cells.** *Radiat Res* 90:339-347, 1982.
123. Hall BG. **Yeast thermotolerance does not require protein synthesis.** *J Bacteriol* 156:1363-1365, 1983.
124. Hallberg RL, Kraus KW y Hallberg EM. **Induction of acquired thermotolerance in *Tetrahymena thermophila*: Effects of protein synthesis inhibitors.** *Mol. Cell. Biol.* 5:2061-2069, 1985.
125. Carper SW, Rocheleau TA y Storm FK. **Increase in thermal resistance by constitutive expression of human hsp27.** *Stress Proteins and the Heat Shock Response* 34. Eds. Morimoto R, Georgopoulos C. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. 1991.
126. Mivechi NF, Monson JM y Hahn GM. **Expression of HSP-28 and three HSP-70 genes during development and decay of thermotolerance in leukemic and nonleukemic human tumors.** *Cancer Res* 51:6608-6614, 1991.
127. Landry J, Chrétien P, Lambert H y col. **Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells.** *J Cell Physiol* 147:93-101, 1991.
128. Polla BS, Bonventre JV y Krane SM. **1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases the toxicity of hydrogen peroxide in the human monocyti line U937: The role of calcium and heat shock.** *The Journal of Cell Biology* 107:373-380,1988.
129. Barbe MF, Tytell M, Gower DJ y Welch WJ. **Hyperthermia protects against light damage in the rat retina.** *Science* 241:1817-1820, 1988.
130. Lee YJ, Perlaky L, Dewey WC, Armour EP y Corry PM. **Differences in thermotolerance induced by heat or sodium arsenite: Cell killing and inhibition of protein synthesis.** *Radiat Res* 121:295-303, 1990.
131. Spitz DR y Li GC. **Heat-induced cytotoxicity in H₂O₂-resistant Chinese hamster fibroblasts.** *J Cell Physiol* 142:255-260, 1990.
132. Wong HR, Menendez IY, Ryan MA, Denenberg AG y col. **Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia.** *Am J Physiol* 275:836-841, 1998.

133. Wong HR, Mannix RJ, Rusnak JM, Boota A y col. **The heat shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:745-751, 1996.
134. Spitz DR, Dewey WC y Li GC. **Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblast.** *J Cell Physiol* 131:364-373, 1987.
135. Jäätelä M, Wissing D, Bauer PA y Li GC. **Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity.** *EMBO J* 11:3507-3512, 1992.
136. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Kronis C y col. **Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblast.** *J Clin Invest* 95:926-933, 1995.
137. Williams RS, Thomas JA, Fina M, German Z y col. **Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress.** *J Clin Invest* 92:503-508, 1993.
138. Huot J, Houle F, Spitz DR y Landry J. **HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress.** *Cancer Res* 56:273-279, 1995.
139. Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J y col. **Constitutive expression of human hsp27, Drosophila hsp27, or human xB-Crystallin confers resistance to TNF and oxidative stress induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblast.** *J Immunol* 154:363-374, 1995.
140. Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR y col. **Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury.** *J Clin Invest* 95:1446-1456, 1995.
141. Plumier JCL, Ross BM, Currie RW, Angelidis CE y col. **Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery.** *J Clin Invest* 95:1854-1860, 1993.
142. Bellman KA, Wenz J, Radons V, Burkart R y col. **Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin.** *J Clin Invest* 95:2840-2845, 1995.
143. Ribeiro SP, Villar MD, Downey GP, Edelson JD y col. **Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis.** *Critical Care Medicine* 22:922-929, 1994.
144. Winston BW, Villar J, Edelson JD y col. **Induction of heat stress proteins (HSP) is associated with decreased mortality in an animal model of hyperoxic lung injury.** *Am Rev Respir Dis* 143:728, 1991.
145. Ryan AJ, Flanagan SW, Moseley PL y col. **Acute heat stress protects rats against endotoxin shock.** *J Appl Physiol* 73:1517-1522, 1992.

146. Villar J, Edelson JD, Post M y Mullen JBM. **Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury.** *Am Rev Respir Dis* 147:177-18, 1993.
147. Villar J, Ribeiro SP, Mullen JBM, Kuliszewski M y col. **Induction of heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model.** *Crit Care Med* 22:914-922, 1994.
148. Waddell TK, Hirai T, Piovesa J, Oka T y col. **The effect of heat shock on immediate post-preservation lung function.** *Clin invest Med* 17:405-413, 1994.
149. Heufelder AE, Goellner JR, Wenzel BE y Bahn RS. **Immunohistochemical detection and localization of a 72-kilodalton heat shock protein in autoimmune thyroid disease.** *J Clin Endocrinol Metab* 74:724-731, 1992.
150. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet J-G y col. **Cancer and the heat shock response.** *European Journal of Cancer* 30:1884-1891, 1994.
151. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR y Rugarli C. **Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells.** *Int J Cancer* 51:613-619, 1992.
152. Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti J-P y col. **Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancer.** *American of Journal Respir Cell Mol Biol* 10:453-461, 1994.
153. Hurlimann J, Gebhard S y Gomez F. **Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas.** *Histopathology* 23:239-248, 1993.
154. Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E y col. **Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions.** *Electrophoresis* 18:582-587, 1997.
155. Cairo G, Schiaffonati L, Rappocciolo E y Tacchini L. **Expression of diferent members of heat shock protein 70 gene family in liver and hepatomas.** *Hepatology* 9:740-746, 1989
156. Thomas SA, Brown IL, Hollins GW, Hocken A y col. **Detection and distribution of heat shock proteins 27 and 90 in human benign and malignant prostatic tissue.** *British Journal of Urology* 77:367-372, 1996.
157. Têtu B, Lacasse B, Bouchard H-L, Lagacé R y col. **Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: A clinicopathological and immunohistochemical study.** *Cancer Research* 52:2325-2328, 1992.
158. Hettinga JVE, Lemstra W, Meijer C, Los G y col. **Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and resistant human tumor cells.** *Int J Cancer* 67:800-807, 1996.
159. Wong HR y Wispe JR. **The stress response and the lung.** *Am J Physiol* 273:1-9, 1997.

160. Wong HR, Ryan M, Gebb S y Wispé JR. **Selective and transient in vitro effects of heat shock on alveolar type II cell gene expression.** *Am J Physiol* 272:132-138, 1997.
161. Wang JR, Xiao XZ, Huang SN, Luo FJ y col. **Heat shock pretreatment prevents hydroge peroxide injury of pulmonary endothelial cells and macrophages in culture.** *Shock* 6:134-141, 1996.
162. Polla BS, Kantengwa S, Gleich GJ, Kondo M y col. **Spontaneous heat shock protein synthesis by alveolar macrophages in interstitial lung disease associated with phagocytosis of eosinophils.** *Eur Respir J* 6:483-488, 1993.
163. Staton JM, Dench JE, Currie B, Fitzpatrick DR y col. **Expression and immune recognition of stress proteins in sarcoidosis and other chronic interstitial lung diseases.** *Immunol Cell Biol* 73:23-32, 1995.
164. Keyse SM y Tyrrell RM. **Heme oxygenase is the major 32-kD stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite.** *Proc Natl Acad Sci USA* 86:99-103, 1989.
165. Bond U y Schleginsner MJ. **Ubiquitin is a heat shock protein in chicken ambryo fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 5:949-956, 1989.
166. Arrigo AP y Landry J. **Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins.** *Biology of heat shock proteins and molecular chaperones* 335-376. Eds. RI Morimoto, A Tissieres y C Georgopoulos. CSH Press. Cold Spring Harbor. NY. 1994.
167. Edwards DP, Adams DJ, Savage N y col. **Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 93:804-812, 1980.
168. Edwards DP, Adams DJ y McGuire WL. **Specific protein synthesis regulated by estrogen in human breast cancer.** *J Steroid Biochem* 15:247-259, 1981.
169. Edwards DP, AdamsDJ, McGuire WL y col. **Estradiol stimulates synthesis of a major intracellular protein in human breast cancer cell line (MCF-7).** *Breast Cancer Res Treat* 1:209-223, 1981.
170. Fuqua SAW, Moretti-Rojas I, Blum M y McGuire WL. **The 24K estrogen-regulated protein is a heat-shock protein.** *Breast Cancer Res Treat* 10:150, 1987.
171. Chamness GC, Ruiz A, Fulcher L y col. **Estrogen-inducible heat shock protein hsp27 predicts recurrence in node-negative breast cancer.** *Proc Am Assoc Cancer Res* 30:252, 1989.
172. Miron T, Wilchek M y Geiger B. **Characterization of an inhibitor of actin polymerization in vinculin-rich fraction of turkey gizzard smooth muscle.** *Eur Biochem* 178:543-553, 1988.
173. Miron T, Vancompernelle K, Vandekerckhove J y col. **A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein.** *J Cell Biol* 114:255-261, 1991.

174. Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA y col. **Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat-shock protein 27.** *Mol Cell Biol* 15:505-516, 1995.
175. Huot J, Roy G, Lambert H, Chretien P y Landry J. **Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mf 27,000 heat shock protein.** *Cancer Res* 51:245-252, 1991.
176. Schardt C, Kasimir-Bauer S, Harstrick A, Huesker JM y col. **Differential mRNA expression of heat shock proteins hsp27, hsp60 y hsp70 in cisplatin and doxorubicin resistant cell lines and regulation by topoisomerase II inhibitors.** *Proc Am Assoc Cancer Res* 36:20, 1995.
177. Mc Guire SE, Fuqua SA, Naylor SL y col. **Chromosomal assignments of human 27-kDa heat shock protein gene family.** *Somat Cell Mol Genet* 15:167-171, 1989.
178. Hickey E, Brandon SE, Potter R, Stein G y col. **Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein.** *Nucleic Acids Res* 14:4127-4145, 1986.
179. Pelham HRB. **Activation of heat shock genes in eukaryotes.** *Trends Genet* 1:31-35, 1985.
180. Amin J, Ananthan J y Voellmy R. **Key features of heat shock regulatory elements.** *Mol Cell Biol* 8:3761-3769.
181. Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL y col. **Biological and clinical implications of heat shock proteins 27 000 (Hsp27): A review.** *Journal of the National Cancer Institute* 85:1558-1570,1993.
182. Morimoto RI. **Cells in Stress: Transcriptional activation of heat shock genes.** *Science* 259:1409-1410, 1993.
183. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J y col. **Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF I.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6906-6910, 1991.
184. Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L y col. **Isolation of a cDNA for HSF 2: Evidence for two heat shock factor genes in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6911-6915, 1991.
185. Ang D, Liberek K, Skowrya D y col. **Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins.** *J Biol Chem* 266:24233-24236, 1991.
186. Sarge KD, Murphy SP y Morimoto RI. **Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity and nuclear localization and can occur in absence of stress.** *Mol Cell Biol* 13:1392-1397, 1993.
187. Arrigo AP, Suhan JP y Welch WJ. **Dynamic changes in the structure and intracellular locale of**

- mammalian low-molecular-weight heat shock protein. Mol Cell Biol* 8:5059-5071, 1988.
188. Lee YJ, Curetty L y Corry PM. **Differences in preferential synthesis and redistribution of HSP70 and HSP27 families by heat or sodium arsenite in Chinese hamster ovary cells.** *J Cell Physiol* 149:77-87, 1991.
189. Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP y col. **Estrogen-induced 24K protein in MCF-7 breast cancer cells is localized in granules.** *Breast Cancer Res Treat* 4:261-268, 1984.
190. Ciocca DR, Asch RH, Adams DJ y col. **Evidence for the modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle.** *J Clin Endocrinol Metab* 57:496-499, 1983.
191. Ciocca DR, Winters CA y Dufau ML. **Expression of an estrogen-regulated protein in rat testis Leydig cells.** *J Steroid Biochem* 24:219-229, 1986.
192. Landry J, Lambert H, Zhou M y col. **Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II.** *J Biol Chem* 267:794-804, 1992.
193. Stokoe D, Engel K, Campbell DG y col. **Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins.** *FEBS Lett* 313:307-313, 1992.
194. Hepburn A, Demolle D, Boeynaems JM y col. **Rapid phosphorylation of a 27 kDa protein induced by tumor necrosis factor.** *FEBS Lett* 227:175-178, 1988.
195. Michishita M, Satoh M, Yamaguchi M y col. **Phosphorylation of the stress protein hsp27 in an early event in murine myelomonocytic leukemic cell differentiation induced by leukemia inhibitory factor/D-factor.** *Biochem Biophys Res Commun* 176:979-984, 1991.
196. Ciocca DR, Jorge AD, Jorge O, Milutín C y col. **Estrogen receptors, progesterone receptors and heat-shock 27-kD protein in liver biopsy specimens from patients with hepatitis B virus infection.** *Hepatology* 13:838-844, 1991.
197. Thor A, Benz C, Moore II D, Goldman E y col. **Articles: Stress-response protein (hsp27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histological, and prognostic correlation.** *Journal of the National Cancer Institute* 83:170-178, 1991.
198. Ciocca DR, Puy LA y Fasoli LC. **Study of estrogen receptor, progesterone receptor, and the estrogen-regulated Mr 24,000 protein in patients with carcinomas of the endometrium and cervix.** *Cancer Res* 49:4298-4304, 1989.
199. King RJB, Finley JR, Coffey AI, Millis RR y col. **Characterization and biological relevance of a 29-kDa, oestrogen receptor-related protein.** *J Steroid Biochem* 27:471-475, 1987.

200. Robertson JFR, Morris DL, Ellis IO, Armitage NC y col. **The prognostic value of the monoclonal antibody (D5) detected protein, p29, in primary colorectal carcinoma.** *Br J Cancer* 64:379-380, 1991.
201. Kato M, Herz F, Kato S y Hirano A. **Expression of stress-response (heat-shock) protein 27 in human brain tumors: An immunohistochemical study.** *Acta Neuropathol* 83:420-422, 1992.
202. Adams DJ, Hajj H, Edwards DP y col. **Detection of a Mr 24,000 estrogen-regulated protein in human breast cancer by monoclonal antibodies.** *Cancer Res* 43:4297-4301, 1983.
203. Ciocca DR, Adams DJ, Bjercke RJ y col. **Immunohistochemical detection of an estrogen-regulated protein by monoclonal antibodies.** *Cancer Res* 43:4256-4258, 1982.
204. Kato S, Hirano A, Kato M, Herz F y Ohama E. **Comparative study on the expression of stress-responsive protein (srp)72, srp27, α B-crystallin and ubiquitin in brain tumours. An immunohistochemical investigation.** *Neuropathology and Applied Neurobiology* 19:436-442, 1993.
205. Chamness GC, Ruiz A, Fulcher L y col. **Stress response protein srp 27 predicts recurrence in node-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 12:130, 1988.
206. Volm M, Koomägi R, Mattern J y Stammers G. **Heat shock (hsp70) and resistance proteins in non-small cell lung carcinomas.** *Cancer Letters* 95:195-200, 1995.
207. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA y Yu YY. **P53 protein accumulation detected by five different antibodies: Relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer.** *Cancer Res* 54:3752-3757, 1994.
208. Volm M, Mattern J y Stammers G. **Up-regulation of heat shock protein 70 in adenocarcinomas of the lung in smokers.** *Anticancer Res* 15:2607-2609, 1995.
209. Koomägi R, Stammers G, Manegold C, Mattern J y col. **Expression of resistance-related proteins in tumoral and peritumoral tissues of patients with lung cancer.** *Cancer Lett* 110:129-136, 1996.
210. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E y col. **A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells.** *Int J Cancer* 61:272-279, 1995.
211. Iwaya K, Tsuda H, Fujita S, Suzuki M y col. **Natural state of mutant p53 protein and heat shock protein 70 in human breast cancer tissues.** *Laboratory Investigation* 72:707-714, 1995.
212. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A y Oren M. **Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins.** *Nature* 320:182-185, 1986.
213. Finlay CA, Hinds PW, Tan T-H, Eliyahu D y col. **Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life.** *Mol Cell Biol*

8:531-539, 1988.

214. Lee LS, Montebello J, Rush M, Georgion T y col. **Overexpression of heat shock protein (hsp) is associated with abnormal p53 expression in cancer of the pancreas.** *Zentralbl Pathol* 140:259-264, 1994.

215. Davidoff AM, Iglehart JD y Marks JR. **Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers.** *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3439-3442, 1992.

216. Kingston RF, Baldwin AS Jr y Sharp PA. **Regulation of heat shock gene 70 expression by c-myc.** *Nature* 312:280-282, 1984.

217. Tauchi K, Tsutsumi Y, Hori S, Yoshimura S y col. **Expression of heat shock protein 70 and c-myc protein in human breast cancer: An immunohistochemical study.** *Jpn J Clin Oncol* 21:256-263, 1991.

218. Taira T, Negishi Y, Kihara F, Iguchi-Arigo SMM y Arigo H. **C-myc protein complex binds to two sites in human hsp70 promoter region.** *Biochim Biophys Acta* 113:166-174, 1992.

219. Hunt C y Morimoto RI. **Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70.** *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6455-6459, 1985.

220. Brown CR, Martin RL, Hansen WJ, Beckmann RP y Welch WJ. **The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion.** *The Journal of Cell Biology* 120:1101-1112, 1993.

221. Milarski KL y Morimoto RI. **Mutational analysis of the human hsp70 protein: Distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding.** *J Cell Biol* 109:1947-1962, 1989.

222. Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W y col. **Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins.** *Nature* 348:137-143, 1990.

223. Schulte AM, Fischer S, Sachse GE, Hafner S y col. **Identification and characterization of a novel hsc70-like gene in the human lung tumor cell line HS24.** *DNA Cell Biol* 16:257-268, 1997.

224. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J y Campbell RD. **Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat-shock protein HSP70.** *Proc Natl Acad Sci* 86:1968-1972, 1989.

225. Wu BJ, Kingsten RE y Morimoto RI. **The human hsp 70 promoter contains at least two regulatory domains.** *Proc Natl Acad Sci USA* 83:629-633, 1986.

226. Pelham HRB. **A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp 70 heat shock gene.** *Cell* 30:517-528, 1982.

227. Yost HJ y Lindquist S. **RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis.** *Cell* 45:185-193, 1986.

228. Abravaya K, Myers MP, Murphy SP y Morimoto RI. **The human heat-shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat-shock gene expression.** *Genes Dev* 6:1153-1164, 1992.
229. Hensold JO, Hunt CR, Calderwood SK y col. **DNA binding of heat shock factor to the heat shock element is insufficient for transcriptional activation in murine erythroleukemia cells.** *Mol Cell Biol* 10:1600-1608, 1990.
230. Di Cesare S, Poccia F, Mastino A y Colizzi V. **Surface expressed heat-shock proteins by stressed or human immunodeficiency virus (HIV)-infected lymphoid cells represent the target for antibody-dependent cellular cytotoxicity.** *Immunology* 76:341-343, 1992.
231. Heufelder AE, Wenzel BE y Bahn RS. **Cell Surface localization of a 72 kilodalton heat shock protein in retro-ocular fibroblasts from patients with Graves'ophthalmopathy.** *J Clin Endocrinol Metab* 74:732-736, 1992.
232. Welch WJ y Feramisco JR. **Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat shocked mammalian cells.** *J Biol Chem* 259:4501-4513, 1984.
233. Botzler C, Issels R y Multhoff G. **Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells in associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells.** *Cancer Immunol Immunother* 43:226-230, 1996.
234. Minota S, Cameron B, Elch WJ y Winfield JB. **Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus.** *J Exp Med* 168:1475-1480, 1988.
235. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA y col. **Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph-node-negative breast cancer: Prognostic implications.** *Cancer Inst* 85:570-574, 1993.
236. Kato S, Hirano A, Kato M, Herz F y col. **Stress-response (heat-shock) protein 72 expression in tumors of the central nervous system: An immunohistochemical investigation.** *Acta Neuropathol* 84:261-264, 1992.
237. Ferrarini M, Pupa SM, Zoocchi MR, Rugarli C y col. **Distinct pattern of HSP72 and monomeric lamin receptor expression in human lung cancers infiltrated by $\gamma\delta$ T lymphocytes.** *Int J Cancer* 57:486-490, 1994.
238. Comini L, Gaia G, Curello S, Ceconi C y col. **Right heart chronically stimulates heat shock protein 72 in heart and liver but not in other tissues.** *Cardiovascular Research* 31:882-890, 1996.
239. Vignola AM, Chanez P, Polla BS, Vic P y col. **Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:683-691, 1995.

240. Watanabe Y, Oda M, Ohta Y, Watanabe S y col. **Surgical results on N2 lung cancer with special reference to correlation between tumor size and extension of lymph node metastases.** *Kyobu-Geka* 52:895-900, 1999.
241. Bronchogenic Carcinoma Cooperative Group of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery. **Clinical tumour size and prognosis in lung cancer.** *Eur Respir J* 14:812-816, 1999.
242. Kamiyoshihara M, Hirai T, Kawashima O, Sakata S y col. **Long-term survival in surgical cases of non-small cell lung cancer with mediastinal nodal involvement.** *Kyobu-Geka* 51:1104-1109, 1998.
243. Konaka C, Ikeda N, Hiyoshi T, Tsuji K y col. **Peripheral non-small cell lung cancers 2.0 cm or less in diameter: Proposed criteria for limited pulmonary resection based upon clinicopathological presentation.** *Lung Cancer* 21:185-191, 1998.
244. Riquet M, Manac'h D, Le Pimpec Barthes F, Dujon A y col. **Prognostic significance of surgical-pathologic N1 disease in non-small cell carcinoma of the lung.** *Ann Thorac Surg* 67:1572-1576, 1999.
245. Urban T, Chastang C, Vaylet F, Mathieu M y col. **Prognostic significance of supraclavicular lymph nodes in small cell lung cancer: A study from four consecutive clinical trials, including 1,370 patients.** *Chest* 114:1538-1541, 1998.
246. Van-Velzen E, Snijder RJ, Brutel de la Riviere A, Elbers HJ. **Type of lymph node involvement influences survival rates in T1N1M0 non-small cell lung carcinoma. Lymph node involvement by direct extension compared with lobar and hilar node metastases.** *Chest* 110:1469-1473, 1996.
247. Okada M, Tsubota N, Yoshimura M, Miyamoto Y y col. **Prognosis of completely resected pN2 non-small cell lung carcinomas: What is the significant node that affects survival?.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 118:270-275, 1999.
248. Van Velzen E, De La Riviere AB, Elbers HJ, Lammers JW y col. **Type of lymph node involvement and survival in pathologic N1 stage III non-small cell lung carcinoma.** *Ann Thorac Surg* 67:903-907, 1999.
249. Wilbur A y Franklin MD. **Diagnosis of lung cancer. Pathology of invasive and preinvasive neoplasia.** *Chest* 117:80-89, 2000.
250. Mountain CF. **Revisions in the international system for staging lung cancer.** *Chest* 111:1710-1717, 1997.
251. Philip C Hoffman, Ann M Maner, Everett E Vokes. **Lung Cancer.** *Lancet* 355:479-485, 2000.
252. Parkin DM, Pisani P y Ferlay J. **Global Cancer Statistics.** *CA Cancer J Clin* 49:33-64, 1999.
253. Greenlee RT, Murray T, Bolden S y Wingo PA. **Cancer Statistics, 2000.** *CA Cancer J Clin* 50:7-33,

2000.

254. Tariq Sethi. *Science, medicine, and the future*. *BMJ* 314:652-655, 1997.
255. Landis SH, Murray T, Bolden S y col. *Cancer Statistics, 1998*. *CA Cancer J Clin* 48:6-29, 1998.
256. Landis SH, Murray T, Bolden S y col. *Cancer Statistics, 1999*. *CA Cancer J Clin* 49:8-31, 1999.
257. Raimundo García del Moral. *Laboratorio de anatomía patológica*. Eds. Interamericana-Mc Graw-Hill. 1993.
258. Brozam M. *Immunohistochemical analysis of formaldehyde -and tripsin or pepsin- treated material*. *Acta Histochem* 63:251-260, 1978.
259. Kato S, Morita T, Hori T, Kato M y col. *Brain tumor: Immunohistochemical studies on the stress-response proteins, p53 protein and proliferating cell nuclear antigen*. *Noshuyo Byori* 12:125-132, 1995.
260. Koshiyama M, Konishi I, Nanbu K, Nanbu Y y col. *Immunohistochemical localization of heat shock proteins HSP 70 and HSP90 in the human endometrium: Correlation with sex steroid receptors and ki67 antigen expression*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:1106-1112, 1995.
261. Goding JW. *Monoclonal antibodies: Principles and practice*. Eds. Academic Press. 1996.
262. Ciocca DR, Admas DJ, Bjercke RJ y col. *Monoclonal antibody storage condition, and concentration effects on immunohistochemical specificity*. *J Histochem Cytochem* 31:691-696, 1983.
263. Taylor CR y Kledzik G. *Immunohistologic techniques in surgical pathology. A spectrum of "new" special stains*. *Hum Pathol* 12:590-596, 1981.
264. Ward JM, Benveniste RE, Fox CH, Battles JK y col. *Autoimmunity in chronic active helicobacter hepatitis of mice. Serum antibodies and expression of heat shock protein 70 in liver*. *Am J Pathol* 148:509-517, 1996.
265. Hsu SM, Raine L y Fanger H. *Use the Avidin-Biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. *J Histochem Cytochem* 29:577-580, 1981.
266. Chaiet L y Wolf FJ. *The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces*. *Arch Biochem Biophys* 106:1-5, 1964.
267. Shi SR, Key ME y Kalra KL. *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections*. *J Histochem Cytochem* 39:741-748, 1991.
268. Kindas Mügge I, Pohl WR, Zavadova E, Köhn HD y col. *Alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome express high levels of heat shock protein 72 mRNA*. *Shock* 5:184-

189, 1996.

269. Navarro D, Cabrera JJ, Falcon O y col. **Monoclonal antibody characterization of progesterone receptors, estrogen receptors and the stress-responsive protein of 27 kDa (SRP27) in human uterine carcinoma.** *J Steroid Biochem* 34:491-498, 1989.

270. Puy LA, LO Castro G, Olcese JE y col. **Analysis of a 24-kilodalton(KD) protein in the human uterine cervix during abnormal growth.** *Cancer* 64:1067-1073, 1989.

271. Strahler JR, Kuick R y Hanash SM. **Diminished phosphorylation of a heat shock protein (HSP27) in infant acute lymphoblastic leukemia.** *Biochem Biophys Res Commun* 175:134-142, 1991.

272. Pechan PM. **Heat shock proteins and cell proliferation.** *FEBS Lett* 280:1-4, 1991.

273. Kao HT, Capasso O, Heintz N y col. **Cell cycle control of the human HSP 70 gene: Implications for the role of a cellular E1A like function.** *Mol Cell Biol* 5:628-633, 1985.

274. Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ y col. **Mitogen and lymphokine stimulation of heat-shock proteins in T lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci* 85:3850-3854, 1988.

275. Oesterreich S, Weng CN, Qin M, Hilsenbeek SG y col. **The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines.** *Cancer Res* 53:4443-4448, 1993.

276. Spector NL, Ryan C, Samson W, Levine H y col. **Heat shock protein is a unique marker of growth arrest during macrophage differentiation of HL-60 cells.** *J Cell Physiol* 156:619-625, 1993.

277. Zantema A, De Jong E, Lardenoije R y col. **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, 1989.

278. Delhaye M, Gulbis B, Galand P, Mairesse N. **Expression of 27-kD heat-shock protein isoforms in human neoplastic and nonneoplastic liver tissues.** *Hepatology* 16:382-389, 1992.

279. Sledge GW, Ramzy I, Dressler LG, Dorr FA, Adams DJ y McGuire WL. **Presence of an estrogen-regulated protein in endometrial cancer.** *Obstet Gynaecol* 66:423-427, 1985.

280. Dressler LG, Ramzy I, sledge GW y McGuire WL. **A new marker of maturation in the cervix: The strogen-regulated 24K protein.** *Obstet Gynecol* 68:825-831, 1986.

281. Tomei LD y Cope FO. **Apoptosis: The molecular basis of cell death.** Eds. Laboratory Press. Cold Spring Harbour. 1991.

282. Trump BF y Berezsky IK. **The role of cytosolic Ca^{2+} in cell injury, necrosis and apoptosis.** *Curr Opin Cell Biol* 4:227-232, 1992.

283. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS y col. **Induction of apoptosis in fibroblast by c-myc protein.** *Cell* 69:119-128, 1992.
284. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. **Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2.** *Nature* 359:552-554, 1992.
285. Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. **Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes.** *Nature* 359:554-556, 1992.
286. Koskinen PJ, Sistonen L, Evan G, Morimoto R y col. **Nuclear colocalization of cellular and viral myc proteins with HSP 70 in myc-overexpressing cells.** *J Virol* 65:842-851, 1991.
287. Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD y Slutsky AS. **Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: Evidence for TNF- α posttranslational regulation.** *Am J Respir Crit Care Med* 154:1843-1850, 1996.
288. Jäättelä M. **Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2.** *J Immunol* 151:4286-4294, 1993.
289. Klostergaard J, Barta M, y Tomasovic SP. **Hyperthermic modulation of tumor necrosis factor-dependent monocyte/macrophage tumor cytotoxicity in vitro.** *J Biol Response Mod* 8:262-277, 1988.
290. Ribeiro SP, Villar J, De Hoyos A y col. **Heat stress decreases tumor necrosis factor release in LPS-stimulated alveolar macrophages.** *Am Rev Respir Dis* 147:229, 1993.
291. Guedson F, Freshney n, Waller RJ, Rawlinson L y Saklatvala J. **Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein hsp 27 and b-casein.** *J Biol chem* 268:4236-4243, 1993.
292. Ciocca DR, Puy LA y Lo Castro G. **Localization of an estrogen-responsive protein in the human cervix during menstrual cycle, pregnancy and menopause, and in abnormal cervical epithelia without atypia.** *Am J Obstet Gynecol* 155:1090-1096, 1986.
293. Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP y col. **Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissues and cells.** *Cancer Res* 43:1204-1210, 1983.
294. Adams DJ y McGuire WL. **Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the estrogen-regulated Mr 24,000 protein in human breast tumors: Correlation with estrogen and progesterone receptors.** *Cancer Res* 45:2445-2449, 1985.
295. Ciocca Dr, Stati AO y Amprino de Castro MM. **Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and**

- endometrial cancer tissue. Breast Cancer Res Treat* 16:243-251, 1990.
296. King RJB, Cano A, Finley J y Coffey AI. **Immunological probes for oestradiol receptors in human breast tumours.** *J Steroid Biochem* 24:369-372, 1986.
297. Horne GM, Angus B, Wright C, Needham G y col. **Relationships between oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor, ER-D5, and p24 oestrogen regulated protein in human breast cancer.** *Journal of Pathology* 155:143-150, 1988.
298. Andersen J, Skovbon H y Poulsen HS. **Immunocytochemical determination of the oestrogen-regulated protein M 24000 in primary breast cancer and response to endocrine therapy.** *Cancer* 66:2390-2394, 1990.
299. Adams DJ, Hajj H, Bitar KG y col. **Purification of an estrogen-regulated breast cancer protein by monoclonal antibody affinity chromatography.** *Endocrinology* 113:415-417, 1983.
300. Ciocca DR, Puy LA, Edwards DP, Adams DJ y col. **The presence of an estrogen-regulated protein detected by monoclonal antibody in abnormal human endometrium.** *J Clin Endocrinol Metab* 60:137-143, 1985.
301. Kost SL, Smith D, Sullivan W y col. **Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor.** *Mol Cell Biol* 9:3829-3838, 1989.
302. Coffey AI y King RJ. **Characterization of p29, an estrogen-receptor associated tumor marker.** *J Steroid Biochem* 31:745-750, 1988.
303. Vargas SO, Leslie KO, Vacek PM, Socinski MA y col. **Estrogen-receptor-related protein p29 in primary nonsmall cell lung carcinoma.** *Cancer* 82:1495-1500, 1998.
304. Ciocca DR y Luque EH. **Immunological evidence for the identity between the hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen receptor-associated protein in breast and endometrial cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 20:33-42, 1991.
305. Mendelsohn ME, Zhu Y y O'Neill S. **The 29-kDa proteins phosphorylated in thrombin-activated human platelets are forms of the estrogen receptor-related 27-kDa heat shock protein.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11212-11216, 1991.
306. Coffey AI, King RJ. **Antibodies to estradiol receptor from human myometrium.** *J Steroid Biochem* 14:1229-1235, 1980.
307. Cano A, Coffey AI, Adaita R y col. **Histochemical studies with an estrogen receptor-related protein in human breast tumors.** *Cancer Res* 46:6475-6480, 1986.
308. Hawkins RA, Sangster K y Krajewski A. **Histochemical studies of human breast cancer using a**

- monoclonal antibody against an oestrogen receptor-related antigen. Br J Cancer* 55:611-616, 1987.
309. Lydyard PM y Van Eden W. **Heat shock proteins: Immunity and immunopathology.** *Immunology Today* 11:228-229, 1990.
310. Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D y col. **Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4267-4270, 1988.
311. Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW y col. **T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein.** *J Immunol* 143:2844-2849, 1989.
312. Young RA. **Stress proteins and immunology.** *Annu Rev Immunol* 8:401-420, 1990.
313. Lamb JR, Val V, Mendez-Samperio P, Mehlert A y col. **Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity.** *Intern Immunol* 1:191-196, 1989.
314. Srivastava PK y Maki RG. **Stress-induced proteins in immune response to cancer.** *Curr Top Microbiol Immunol* 167:109-123, 1991.
315. Udono H y Srivastava PK. **Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity.** *J Exp Med* 178:1391-1396, 1993.
316. Ohguro H, Ogawa K y Nakagawa. **Recoverin and Hsc 70 are found as autoantigens in patients with cancer-associated retinopathy.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:82-89, 1999.
317. Kaufmann SHE. **Heat-shock proteins and the immune response.** *Immunol Today* 11:129-136, 1990.
318. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Essler M y Issels RD. **HSP72-an antigenic determinant for non-MHC restricted cytotoxic effector cells.** *J Cell Biochem* 17:417, 1993.
319. Koga T, Wand-Würtenberger A, De Bruyn J, Munk ME y col. **T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages.** *Science* 245:1112-1115, 1989.
320. Fisch P, Malkovsky M, Kovats S, Sturm E, Braakman E y col. **Recognition by human Vgamma9/Vdelta2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells.** *Science* 250:1269-1273, 1990.
321. Udono H y Srivastava P. **Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90 and hsp70.** *Journal of Immunology* 152: 5398-5403, 1994.
322. Born W, Dallas MP, Reardon C, Kubo R y col. **Recognition of heat shock proteins and cell function.** *Immunol Today* 11:40-43, 1990.
323. Kaufmann SHE y Kabelitz D. **Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins.** *Current Topics Microbiol Immunol* 167:191-207, 1991.

324. Srivastava PK y Heike M. **Tumor-specific immunogenicity of stressed-induced proteins: convergence of two evolutionary pathways of antigen presentation?**. *Semin Immunol* 3:57-64, 1991.
325. Vanbuskirk A, Crump BL, Margoliash E y Pierce SK. **A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family**. *J Exp Med* 170:1799-1809, 1989.
326. Yoshino I, Goedegebuure PS, Peoples GE, Lee K-Y y Eberlein TJ. **Human tumor-infiltrating CD4⁺ T cells react to B cell lines expressing heat shock protein 70**. *The Journal of Immunology* 153:4149-4158, 1994.
327. Zocchi MR, Ferrarini M y Rugarli C. **Selective lysis of the autologous tumor by deltaTCS1⁺ gamma/delta⁺ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas**. *Eur J Immunol* 20:2685-2689, 1990.
328. Fuqua SAW, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD y col. **Heat shock proteins and drug resistance**. *Breast Cancer Treat* 32:67-71, 1994.
329. Li GC. **Heat-shock proteins: Role in thermotolerance, drug resistance, and relationship to DNA topoisomerases**. *NCI Monogr* 4:99-103, 1987.
330. Li GC y Hahn GM. **Ethanol-induced tolerance to heat and to adriamycin**. *Nature* 274:699-701, 1978.
331. Donaldson SS, Gordon LF y Hahn GM. **Protective effect of hyperthermia against cytotoxicity of actinomycin D on Chinese hamster cells**. *Cancer Treat Rep* 62:1489-1495, 1978.
332. Wallner K y Li GC. **Adriamycin resistance, heat resistance and radiation response in Chinese hamster fibroblast**. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 12:829-833, 1986.
333. Oesterreich S, Schunck H, Benndorf R y Bielka H. **Cisplatin induces the small heat-shock protein hsp25 and thermotolerance in Ehrlich ascites tumor cells**. *Biochem Biophys Res Comm* 180:243-248, 1991.
334. Moseley PJ, York PJ y York J. **Bleomycin induces the HSP-70 heat shock promoter in cultured cells**. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1:89-93, 1989.
335. Alan R. L. **Stress-induced proteins**. Eds. Pardue ML, Feramisco JR y Lindquist S. New York, 1989.
336. Huot J, Lambert H, Roy G y col. **Atypical multidrug resistance conferred by expression of the human hsp27 heat shock gene in Chinese hamster cells**. *Eur J Pharmacol* 183:1632-1633, 1990.
337. Oesterreich S, Ciocca DR, Wiebe V y col. **Association between heat shock proteins and drug resistance in human breast cancer cells**. *Breast Cancer Res Treat* 23:178, 1992.
338. Volm M, Samsel B y Mattern J. **Relationship between chemoresistance of lung tumours and**

- cigarette smoking. Br J Cancer* 62:255-256, 1990.
339. Volm M y Mattern J. **Resistance mechanisms and their regulation in lung cancer.** *Crit Rev Oncog* 7:227-244, 1996.
340. Dunn DK, Whelan RDH, Hill B y King RJB. **Relationship and oestrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell lines.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:469-479, 1993.
341. Seymour L, Bezwoda WR y Meyer K. **Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer:the presence of p24 predicts for response to treatment and duration of survival.** *Cancer* 66:2390-2394, 1990.
342. Morino M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, Shirakami T y col. **Specific regulation of HSPs in human tumor cell lines by flavonoids.** *In Vivo* 11:265-270, 1997.
343. Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M y col. **Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations.** *Science* 278:117-120, 1997.
344. Srivastava PK, DeLeo AB, Old LJ. **Tumor rejection antigens of chemically induce sarcomas of inbred mice.** *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3407-3411, 1986.
345. Servadio C y Leib Z. **Local hyperthermia for prostate cancer.** *Urology* 38:307-309, 1991.
346. Crile G. **The effects of heat and radiation on cancers implanted onthe feet of mice.** *Cancer Res* 23:372-380, 1963.
347. Galen WP. **Hyperthermia and chemotherapy.** *Adv Exp Med Biol* 267:209-216, 1990.
348. Courtney SP, Williams S y Mansel RE. **Evaluation of immunohistochemical staining of breast tissue by an oestrogen-regulated protein, 24K according to epidemiological and radiological breast cancer risk criteria.** *Cancer Lett* 54:75-80, 1990.
349. Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Miller GA y col. **A study of heat shock protein 27 in endometrial carcinoma.** *Gynecol Oncol* 72:347-350, 1999.
350. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Fuqua SAW y col. **Clinical sinificance of heat-shock/stress-response proteins in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 16:146, 1990.
351. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC y col. **Heat shock/stress responsive proteins: Biological and clinical significance in breast cancer.** *Proc Am Soc Clin Oncol* 9:84, 1990.
352. Storm FK, Mahvi DM y Gilchrist KW. **Lack of association between necrosis and hsp-27 expression in primary breast cancer.** *J Surg Oncology* 61:14-16, 1996.
353. Harrison JD, Jones JA, Ellis IO y Morris DL. **Oestrogen receptor D5 antibody is an independent negative prognostic factor in gastric cancer.** *Br J Surg* 78:334-336, 1991.

354. Têtu B, Brisson J, Landry J y Huot J. **Prognostic significance of heat-shock protein-27 in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study.** *Breast Cancer Res Treat* 36:93-97, 1995.
355. Storm FK, Mahvi DM y Gilchrist KW. **Hsp-27 has no diagnostic or prognostic significance in prostate or bladder cancers.** *Urology* 42:379-382, 1993.
356. Cohen DS, Palmer E, Welch WJ y Sheppard D. **The response of guinea pig airway apithelial cells and alveolar macrophages to environmental stress.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:133-143, 1995.
357. Brandes ME y Finkelstein JN. **Induction of the stress responses by isolation of rabbit type II pneumocytes.** *Exp Lung Res* 15:93-111, 1989.
358. Clerget M, Polla BS. **Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages.** *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1081-1085, 1990.
359. Stammler G, Koomägi R, Mattern J y Volm M. **Comparison of the mRNA expression of factors related to drug resistance in lung tumors and adjacent normal tissues.** *Int J Oncol* 8:537-542, 1996.
360. Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Ciocca DR, Allred DG y col. **The small heat shock protein HSP27 is not an independent prognostic marker in axillary lymph node-negative breast cancer patients.** *Clinical Cancer Research* 2:1199-1206, 1996.
361. Lemieux P, Oesterreich S, Lawrence JA, Steeg PS y col. **The small Heat Shock Protein Hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells.** *Invasion Metastasis* 17:113-123, 1997.
362. Hitotsumatsu T, Iwaki T, Fukui M y Tateishi J. **Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and α B-crystallin) in human brain tumors.** *Cancer* 77:352-361, 1996.
363. Love S y King RJB. **A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer.** *Br J Cancer* 69:743-748, 1994.