

Influencia del tipo de patología y la edad en la expresión hepática de la proteína de choque Hsp27

María Loreto Álvarez-Nebreda^a, Federico Álvarez^b, María Luisa Arranz^b y Emilio Álvarez-Fernández^b

^aServicio de Geriatria. Hospital Gregorio Marañón. Madrid. España.

^bServicio de Anatomía Patológica. Hospital Gregorio Marañón. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: analizar las diferencias en intensidad y en porcentaje de hepatocitos que expresa la proteína de choque Hsp27 al comparar: a) hígados normales frente a patológicos; b) lo previo en mayores de 70 años; c) los adultos de mediana edad (65 años o menores) frente a ancianos (mayores de 70 años), y d) el grupo de mayores de 65 años por rangos de edad.

Material y métodos: se estudia biopsias hepáticas con distintas patologías: normal, inflamatoria y trasplante. Se analiza mediante análisis inmunohistoquímico si la proteína Hsp27 se expresa, así como la zona, intensidad y porcentaje de hepatocitos. Se compara la expresión entre hígados con/sin patología y por edad.

Resultados: se examina 33 biopsias hepáticas. Un 68% son varones. La edad media es $64,4 \pm 12$ años. La edad media es 55 ± 9 años en el grupo de «adultos de mediana edad» ($n = 18$) y 75 ± 3 años en el grupo de «ancianos» ($n = 15$). No hay diferencias en las características basales. Se clasifican por patología en: normal (21%), inflamatoria (49%) y postrasplante (30%). La zona captante predominante es la central 33%. La intensidad es fuerte (2 o 3) en el 61%. El porcentaje de hepatocitos que expresa la Hsp27 es bajo (menos del 25%) en un 67%. Los hígados patológicos presentan un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 con mayor frecuencia que los normales (el 56 frente al 0%, $p = 0,06$). En pacientes mayores de 70 años, los hígados con patología inflamatoria presentan un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 con mayor frecuencia que los normales (el 56 frente al 0%, $p = 0,04$). El porcentaje de «adultos de mediana edad» con un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 respecto al de «ancianos» es del 17 frente al 56% ($p = 0,29$). El porcentaje de «ancianos de 65-75 años» con un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 respecto al de «ancianos de 75 años o más» es del 25 frente al 75% ($p = 0,12$). No hay diferencias entre grupos en la intensidad de la expresión o la zona predominante.

Conclusiones: los resultados sugieren que la proteína de choque Hsp27 se expresa en mayor porcentaje de hepatocitos en los hígados patológicos frente a los normales, tanto en población general como en el grupo de pacientes mayores de 70 años.

Palabras clave

Proteínas de choque térmico. Hsp27. Envejecimiento. Hígado.

Influence of disease and age on liver expression of heat shock protein Hsp27

ABSTRACT

Introduction: to analyze differences in the intensity and percentage of hepatocytes expressing heat shock protein Hsp27 by comparing: a) normal and diseased livers; b) normal and diseased livers in persons older than 70 years; c) middle aged adults (younger than 65 years) and the elderly (older than 70 years), and d) the group aged more than 65 years by age range.

Material and methods: thirty-three liver biopsies from individuals with distinct diseases (normal, inflammatory, transplant) were stained for Hsp27 by immunohistochemistry. Positive staining, and the intensity and percentage of stained hepatocytes were recorded. The results were correlated with age and clinical data (normal liver or inflammatory disease).

Results: thirty-three liver biopsies were analyzed. Sixty-eight percent were taken from men. The mean age was 64.4 ± 12 years. Age was 52 ± 11 years in the group aged less than 65 years ($n = 18$) and 75 ± 3 years in the group aged more than 70 years ($n = 15$). No differences in baseline characteristics were found. Twenty-one percent of biopsies were normal, 49% were inflammatory, and 30% were posttransplantation. The main area of uptake was central (33%). Intensity was strong (2 or 3) in 61%. The percentage of hepatocytes expressing Hsp27 was low (percent of stained lobule < 25%) in 67%. Diseased livers more frequently showed a high percentage of hepatocytes expressing Hsp27 than did normal livers (42% versus 0%, $p = 0.06$). In the group aged more than 70 years, inflammatory livers more frequently showed a high percentage of hepatocytes with Hsp27 than did normal livers (56% versus 0%, $p = 0.04$). Seventeen percent of patients aged 65 years or younger showed a high percent of hepatocytes with Hsp27 versus 56% of those aged more than 70 years ($p = 0.29$). Twenty-five percent of patients aged 65-75 years old showed a high percentage of hepatocytes with HSP27 versus 75% of those aged more than 75 years ($p = 0.12$). No differences in intensity or the predominant area stained were found.

Conclusions: the results suggest that Hsp27 protein is expressed in a greater percentage of hepatocytes in diseased livers than in normal livers, both in the general population and in patients older than 70 years.

Key words

Heat Shock proteins. Hsp27. Aging. Liver.

Correspondencia: Dra. M.L. Álvarez Nebreda.
Servicio de Geriatria. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
C/ Doctor Esquerdo, 46. 28007 Madrid. España.
Correo electrónico: alvareznebreda@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos, desde las bacterias a los seres humanos y plantas, responden a la hipertermia sintetizando un grupo de proteínas conocidas como «proteínas de choque térmico» (*heat shock proteins*, Hsp). Éstas existen en todas las células en condiciones normales y están localizadas en el citosol, en las mitocondrias, en el retículo endoplasmático o en el núcleo. Se dividen en familias en función del peso molecular (de unos 15 a 110 kD) y la misión que desempeñen. La Hsp27 pertenece al grupo de las *small* Hsp¹.

Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de Hsp27 en células de mamíferos es suficiente condición para conferir termorresistencia^{2,3}.

La síntesis de Hsp es inducida no sólo ante el estrés térmico, sino también tras la exposición a quimioterapéuticos, etanol, metales pesados, análogos de aminoácidos o radicales libres, entre otros⁴.

Uno de los mecanismos por los que el estrés térmico o químico daña a los seres vivos es la desnaturalización proteica. Las Hsp son las encargadas de reparar el daño proteotóxico originado por estos agentes. Su misión es conservar las proteínas celulares en la configuración y concentración apropiada para desarrollar adecuadamente su función. Están implicadas en el plegamiento de las proteínas recién formadas y en la reestructuración de las deterioradas, previenen la agregación proteica, seleccionan las que los proteasomas y los lisosomas deben eliminar, participan en el proceso de apoptosis y están relacionadas con el control de la respuesta inmune y la inflamación⁵.

Una de las primeras consecuencias del estrés térmico en eucariotas es la disrupción del citoesqueleto y la inestabilidad de los filamentos de actina, factor importante en la supervivencia de las células expuestas a hipertermia y otras tensiones⁶⁻¹⁰. La termorresistencia celular se correlaciona con la cantidad de Hsp27 presente en el momento del estrés térmico, ya que la sobreexpresión de Hsp27 confiere una gran estabilidad a las fibras de actina durante la hipertermia permitiendo la supervivencia celular³. Recientemente se ha descubierto además que tanto la Hsp27 como las Hsp70 y Hsp90 son moléculas inhibidoras de la apoptosis celular^{11,12}. También hay que destacar el papel de la Hsp27 como marcador pronóstico de ciertos tumores, como el hepatocarcinoma (CHC), el cáncer de mama, el astrocitoma cerebral o el fibrohistiocitoma maligno¹³⁻¹⁶.

Por otra parte, determinados cambios en la expresión de las Hsp pueden ser importantes para que un individuo envejezca, ya que la senescencia se caracteriza fisiológicamente por una disminución en la capacidad de los organismos para defenderse del estrés ambiental¹⁷. El envejecimiento lleva consigo un aumento en la tasa de modificación proteica: en un anciano de 80 años, una por-

ción importante de sus proteínas pueden llegar a estar oxidadas en el caso de un estrés oxidativo suficientemente intenso¹⁸⁻²⁰.

Estudios experimentales en animales han demostrado que, aunque el envejecimiento no modifica o en algunos casos aumenta per se el nivel basal de Hsp (respuesta adaptativa), sin embargo provoca un defecto en la producción de Hsp inducida por el estrés de hasta un 50% en comparación con animales jóvenes^{1,11,21-24}. Y si el sistema que repara el daño proteotóxico está mermado o no funciona correctamente, a medida que envejecemos se produce una acumulación de proteínas alteradas que da lugar a muchas de las enfermedades relacionadas con la edad como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y otros procesos neurodegenerativos, las cataratas, la aterosclerosis o el cáncer^{5,19,25}.

Hay pocos estudios que investiguen sobre la expresión de la Hsp27 en muestras hepáticas humanas^{13,26-30}.

Nuestro estudio pretende describir las diferencias en la expresión de la Hsp27 entre hígados con y sin patología y la variación de ésta con el envejecimiento en muestras humanas.

MATERIAL Y MÉTODO

Población y procesamiento de muestras

Se trata de un estudio de carácter observacional y retrospectivo. Se incluyó 33 biopsias hepáticas consecutivas realizadas en el Hospital Gregorio Marañón en el año 2003, identificadas tras obtener un listado del GRD (grupos relacionados de diagnósticos o sistema de clasificación de pacientes que permiten agruparlos según complejidad o gravedad) de procedimiento «biopsia hepática» y cuyas muestras permanecen en el archivo histórico del servicio de anatomía patológica de este hospital. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: toda biopsia hepática de paciente con edad \geq 18 años, sea cual fuere la patología diagnosticada. Se excluyó a los pacientes en los que, por algún motivo excepcional, no se tuvo acceso a sus datos clínicos.

Las muestras se clasificaron según el grupo diagnóstico al que pertenecían. Distinguimos dos grupos:

- Biopsias con resultado normal (ausencia de hallazgos histológicos patológicos)

- Biopsias con patología de carácter inflamatorio, entre las que distinguimos: hepatitis agudas de diferentes orígenes como virales, medicamentosas, alcohólicas, etc., hepatitis crónicas de origen viral, tuberculoso, tóxico y autoinmune y, por último, cirrosis sobre hepatitis crónicas por el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), alcohólicas o criptogénicas.

Respecto a las biopsias de injerto hepático (postrasplante), en este estudio sólo analizaremos aquéllas con patología inflamatoria (hepatitis aguda o crónica sobre injerto) o con hallazgos histológicos de rechazo, y se incluirán en el grupo previamente mencionado de biopsias con patología inflamatoria, en los dos primeros análisis. En las dos últimas comparaciones, puesto que no hay biopsias de injerto hepático en ancianos y para hacer los grupos comparables, únicamente se analizarán en los dos grupos («adultos de mediana edad» y «ancianos», y en la última comparación «ancianos de 65-75 años» y «ancianos de 75 años o más») los hígados inflamatorios no procedentes de biopsias de injerto.

Los cortes histológicos se recogieron en portaobjetos silanizados. El procesamiento para las tinciones inmunohistoquímicas se realizó automáticamente en un equipo Techmate de acuerdo con un protocolo que, de modo resumido, consiste en desparafinar los cortes en xileno e hidratarlos en alcoholes de graduación decreciente. Posteriormente, las muestras se sumergieron en búfer citrato (10 mmol/l, pH = 6) y se calentaron en un microondas de 500 vatios de potencia durante 15 min. A continuación se les aplicó suero no inmune durante 10 min, seguido de una incubación con anticuerpo anti-Hsp27 humana (clon SX53G8, Dako, Cal.) a una dilución de trabajo 1:100. Posteriormente se lavaron con búfer fosfato salino durante 5 min. El revelado se realizó mediante Emvision® (Dako). Posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina y se montaron en gelatina de glicerol.

La cuantificación de la positividad para Hsp27 de las biopsias teñidas fue realizada por un patólogo, y se calculó el porcentaje de hepatocitos con expresión positiva en campos microscópicos no solapados. Se utilizó los rangos arbitrarios que se muestran a continuación:

- 0: 0-5% de hepatocitos con tinción positiva para Hsp27.
- 1: 6-25% de hepatocitos con tinción positiva para Hsp27.
- 2: 26-50% de hepatocitos con tinción positiva para Hsp27.
- 3: 51-75% de hepatocitos con tinción positiva para Hsp27.
- 4: > 75% de hepatocitos con tinción positiva para Hsp27.

Como resumen de los anteriores, y a partir de los rangos utilizados previamente en otros estudios, simplificamos la expresión en dos:

Porcentaje «alto» de hepatocitos con Hsp27 (rangos 2, 3 y 4 previos): > 25% de hepatocitos expresan la Hsp27.

Porcentaje «bajo» de hepatocitos con Hsp27 (rangos 0 y 1 previos): ≤ 25% de hepatocitos la expresan.

El grado de intensidad de la expresión de la Hsp27 en hepatocitos también se evaluó de forma semicuantitativa por el patólogo, de forma que se consideró:

- Ausencia de intensidad o intensidad débil: grados 0 y 1.
- Intensidad fuerte: grados 2 y 3.

Dos patólogos especialmente entrenados leyeron cada muestra en el microscopio, y se alcanzó un diagnóstico de consenso.

Se tomó fotografías de cada espécimen una vez completada la tinción.

Variables del estudio

Se revisó retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes. Las principales variables recogidas en este estudio fueron:

- Variables demográficas: fecha de nacimiento, sexo.
- Comorbilidad: existencia o no de antecedentes personales de hipertensión, diabetes mellitus, dislipemia, insuficiencia cardíaca, enfermedad vascular periférica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insuficiencia renal crónica, neoplasia y datos de hipertensión portal: historia previa de descompensación edematoascítica, encefalopatía hepática o varices esofágicas.

Respecto a las variables relacionadas con las biopsias hepáticas, analizamos:

- Presencia o no de la proteína de choque Hsp27.
- Área predominante de expresión dentro del lobulillo hepático:

1. Central: se expresa en área 3 o centrolobulillar.
2. Difusa: se expresa de forma homogénea en todo el lobulillo.
3. Asociada a lesión: expresión asociada a una estructura concreta, como puede ser un granuloma, los septos fibrosos o peritumoral.

- Porcentaje de hepatocitos en que la proteína se expresa:

1. Porcentaje alto: > 25% de hepatocitos expresan la Hsp27.

2. Porcentaje bajo: ≤ 25% de hepatocitos la expresan.

- Intensidad de la expresión en los hepatocitos:

1. Ausencia de intensidad o intensidad débil: grados 0 y 1.

2. Intensidad fuerte: grados 2 y 3.

Análisis estadístico

Para evaluar si había diferencias entre grupos respecto a sus características basales, se analizaron las variables continuas mediante la t de Student, y para las variables categóricas se usó la prueba de la χ^2 .

La expresión de la proteína de choque Hsp27 entre hígados con/sin patología y en función del grupo de edad al que pertenecían se comparó mediante el test exacto de Fisher.

Se analizaron los datos con el programa estadístico SPSS® versión 11.5. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

De las 33 biopsias hepáticas incluidas en el estudio, un 68% pertenece a varones. Las características basales se presentan en la tabla 1. La edad media es de 64 ± 12 años (39-82). La edad media por subgrupos es 55 ± 9 años en el grupo de «adultos de mediana edad» (65 años o menores, $n = 18$) y 75 ± 3 años en el de «ancianos» (mayores de 70 años, $n = 15$). No hay diferencias significativas en las características basales de los subgrupos en ninguna de las comparaciones realizadas (hígados normales frente a patológicos y entre los diferentes grupos de edad), salvo por la mayor presencia de EPOC en el grupo de pacientes «ancianos» (el 53% [8/15] frente al 7% [1/14]; $p < 0,05$) (tabla 2).

Las biopsias hepáticas se clasifican por patología en: normal (21%) e inflamatoria (79%) (inflamatoria sobre in-

TABLA 1. Características basales

Número	33
Edad media \pm DS (rango)	64 ± 12 (39-82)
Sexo varón, n (%)	22 (68)
Comorbilidad, n (%)	
HTA	15 (52)
DM	8 (28)
Dislipemia	5 (17)
Insuficiencia cardíaca congestiva	2 (7)
Enfermedad vascular periférica	4 (14)
EPOC	9 (31)
Insuficiencia renal crónica	2 (7)
Neoplasia	13 (43)
Hipertensión portal	15 (50)

DS: desviación estándar; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

jerto [30%]). La zona captante predominante es la central (33%) seguida de la asociada a lesión (27%). La intensidad es fuerte (2 o 3) en el 61%. El porcentaje de hepatocitos que expresa la Hsp27 es alto (más del 25%) en un 33%.

El tipo de patología y la distribución de la expresión de Hsp27 en la biopsias hepáticas en función de la edad se presentan en la tabla 3. El porcentaje de hepatocitos que expresa la Hsp27 por análisis inmunohistoquímico según la patología se presenta en la tabla 4. En la figura 1 podemos apreciar las diferencias en los porcentajes de hepatocitos que expresan la proteína Hsp27 entre el tejido hepático normal y la hepatitis crónica C evolucionada.

Para analizar las diferencias en intensidad y porcentajes de hepatocitos que expresan la proteína de choque Hsp27 se realizan las siguientes comparaciones:

TABLA 2. Diferencias en las características basales entre los grupos de «adultos de mediana edad» y «ancianos»

	Adultos de mediana edad (≤ 65 años)	Ancianos (edad > 70 años)
Número	17	15
Edad (media \pm DS)	55 ± 9	75 ± 3
Comorbilidad (%)		
HTA	36	67
DM	29	27
Dislipemia	14	20
Insuficiencia cardíaca congestiva	0	13
Enfermedad vascular periférica	7	20
EPOC	7	53*
Insuficiencia renal crónica	0	13
Neoplasia	27	60
Hipertensión portal	64	36

DS: desviación estándar; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

* $p < 0,05$.

TABLA 3. Tipo de patología y distribución de la expresión de Hsp27 en la biopsias hepáticas en función de la edad

	Adultos de mediana edad (≤ 65 años)	Ancianos (edad > 70 años)
Número	17	15
Edad, media \pm DS	55 \pm 9	75 \pm 3
Tipo de patología, n (% del total)		
Normal	1 (3)	6 (19)
Inflamatoria	6 (19)	9 (28)
Inflamatoria sobre injerto	10 (31)	0 (0)
Zona captante de Hsp27, n (% del total)		
No capta	4 (12)	2 (6)
Centrolobulillar	7 (22)	4 (12)
Asociada a lesión	3 (9)	6 (19)
Difusa	4 (12)	3 (9)
Subgrupo de biopsias con patología inflamatoria (n = 15), n	6	9
Intensidad de expresión «fuerte» (2 o 3), n, (%)	4 (67)	7 (78)
Porcentaje «alto» de hepatocitos con Hsp27 ($> 25\%$ la expresan), n (%)	1 (17)	5 (56)*

DS: desviación estándar.

*p < 0,05.

TABLA 4. Porcentaje de hepatocitos que expresa la Hsp27 por inmunohistoquímica según patología

Porcentaje de hepatocitos positivos para Hsp27	Hígado normal (n = 7)	Patología inflamatoria (n = 16)	Trasplante-patología inflamatoria (n = 5)	Trasplante-rechazo (n = 5)
0-5	1	4	1	1
6-25	6	6	2	1
26-50		1	1	1
51-75		5	1	
> 76				2

1. Hígados normales frente a patológicos.

Los hígados patológicos presentan un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 con mayor frecuencia que los normales (11/26, 42% frente a 0/7, 0%, $p = 0,06$) (fig. 2).

2. Hígados normales frente a patológicos en pacientes mayores de 70 años.

En pacientes mayores de 70 años, los hígados con patología inflamatoria presentan un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 con mayor frecuencia que los normales (5/9, 56% frente a 0/6, 0%, $p = 0,04$) (fig. 3).

3. En hígados con patología inflamatoria, los «adultos de mediana edad» (65 años o menores, edad media: 55 \pm 9 años) frente a «ancianos» (mayores de 70 años, edad media: 75 \pm 3 años).

El porcentaje de «adultos de mediana edad» con un porcentaje alto de hepatocitos con Hsp27 respecto al de «ancianos» es del 17% (1/6) frente al 56% (5/9) ($p = 0,29$) (fig. 4).

4. En hígados con patología inflamatoria, el grupo de mayores de 65 años por rangos de edad.

El porcentaje de «ancianos de 65-75 años» con un porcentaje alto de hepatocitos con HSP27 respecto al de «ancianos de 75 años o más» es del 25% (3/12) frente al 75% (3/4) ($p = 0,12$) (fig. 5).

Hemos expuesto las diferencias entre grupos en cuanto a porcentaje de hepatocitos que expresan la Hsp27. No hay diferencias entre grupos en la intensidad de la expresión o la zona predominante.

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la proteína de choque Hsp27 se expresa en un porcentaje mayor de hepatocitos en los hígados patológicos frente a los normales y esta diferencia es más acusada y alcanza la significación estadística cuando analizamos el grupo de pacientes mayores de 70 años. Hay escasos estudios que

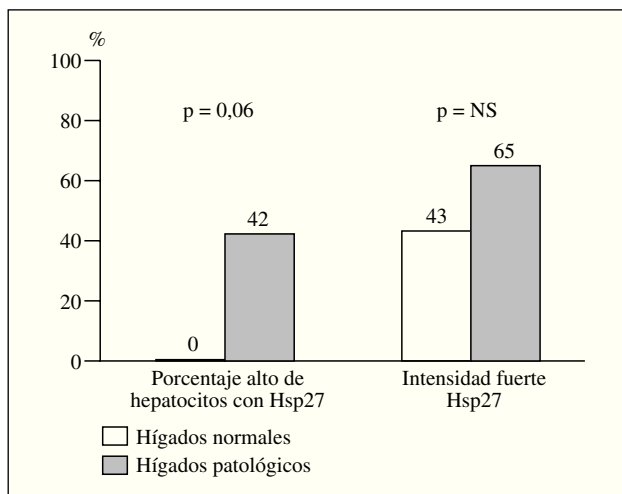


Figura 1. Diferencias en intensidad y en porcentaje de hepatocitos que expresa la proteína de choque Hsp27 al comparar biopsias normales con biopsias con patología inflamatoria.

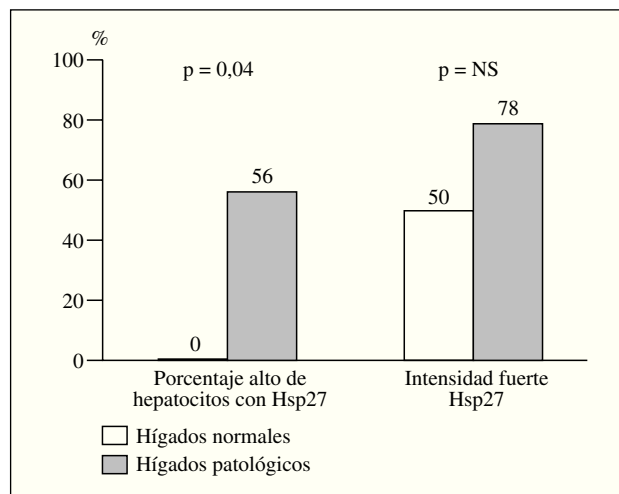


Figura 2. Diferencias en intensidad y en porcentaje de hepatocitos que expresa la proteína de choque Hsp27 al comparar biopsias normales con biopsias con patología inflamatoria en el subgrupo de pacientes mayores de 70 años.

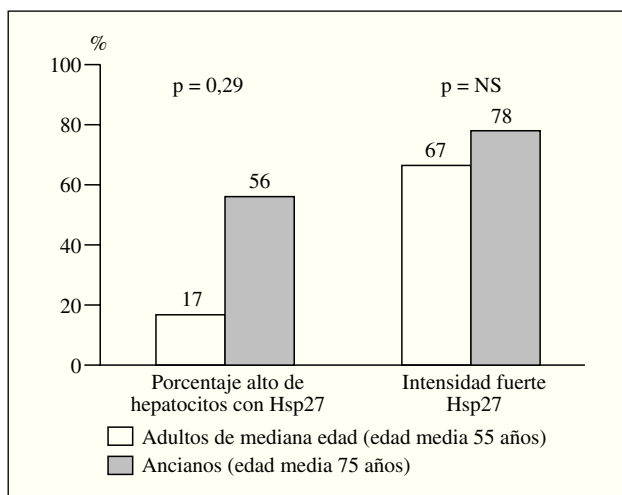


Figura 3. Diferencias en intensidad y en porcentaje de hepatocitos que expresa la proteína de choque Hsp27 al comparar biopsias con patología inflamatoria de adultos de mediana edad con las de ancianos mayores de 65 años.

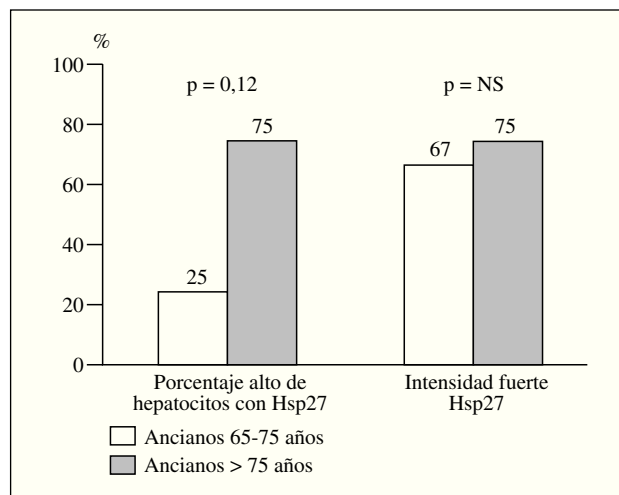


Figura 4. Diferencias en intensidad y en porcentaje de hepatocitos que expresa la proteína de choque Hsp27 al comparar biopsias con patología inflamatoria de ancianos con edades comprendidas entre 65 y 75 años con las de ancianos mayores de 75 años.

determinen el grado de expresión de la Hsp27 en biopsias hepáticas humanas normales, en comparación con biopsias correspondientes a otras patologías. Ciocca et al²⁷ examinan la expresión de Hsp27 en muestras hepáticas de pacientes con/sin infección por el VHB. La mayor parte de las biopsias mostraba una expresión baja de la Hsp27. Los mismos hallazgos se encontraron en el estudio de King et al¹³, que describía la relación entre la expresión de la Hsp27 en CHC y el grado histológico y la supervivencia de los pacientes. La mayor parte de ellos eran portadores del VHB, además de haber desarrollado un CHC y el tejido circundante expresaba pobremente la Hsp27. El estudio extraía las siguientes conclusiones sobre la expresión de la Hsp27: es mayor en el CHC que en

el tejido circundante, es mayor a mayor grado histológico del tumor, cuanto mayor es hay una menor supervivencia libre de enfermedad a los 5 años y una menor supervivencia global. Otro estudio, el de Delahye et al²⁶ con una muestra de sólo 12 pacientes, también encontraba diferencias en la expresión de Hsp27 entre tejidos no neoplásicos y CHC (mayor expresión en estos últimos). Por último reseñar que Lim et al²⁸, en un trabajo muy reciente, no solamente describe la expresión de la Hsp27 en pacientes con infección por el VHB en tejidos normales, nódulos hepáticos displásicos y CHC divididos en 3 grados de diferenciación histológica, sino que demuestra que hay una correlación moderada (Spearman's $r = 0,4-0,75$) entre la expresión de Hsp27 y la hepatocarcinogénesis (a mayor

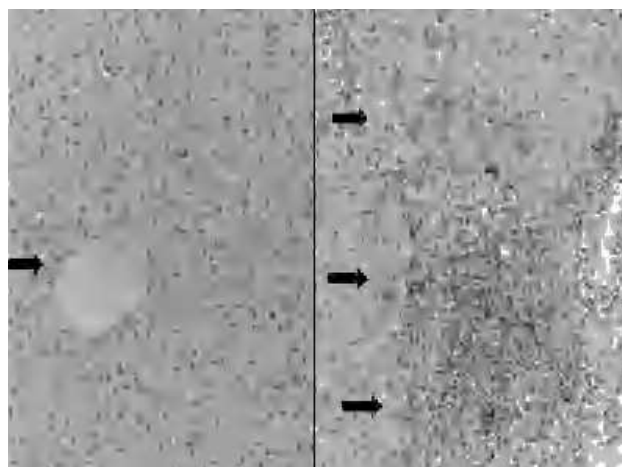


Figura 5. Izquierda: hígado normal. Ausencia de expresión de Hsp27 en el lóbulo hepático a excepción de alguna célula aislada en las inmediaciones de la vena central (flecha) (x40). Derecha: expresión incrementada de Hsp27 en la hepatitis C crónica evolucionada. Se observan células teñidas en la interfaz y en las proximidades de los puentes (flecha) (x100). Demostración inmunohistoquímica de la proteína mediante avidina-biotina y contraste nuclear con hematoxilina.

expresión de Hsp27, mayor agresividad de la lesión). En relación también con la significación pronóstica de la Hsp27, Harimoto et al³⁰ describían cómo la expresión alta de Hsp27 se asociaba a mal pronóstico del CHC en presencia de VHB y, sin embargo, a buen pronóstico del CHC en caso de VHC. En nuestro estudio también disponíamos de biopsias de CHC, pero el reducido tamaño de la muestra no permitía realizar análisis más en profundidad. Tampoco había suficientes muestras de hígados normales como para hacer una comparación de la expresión de Hsp27 en hígados normales entre ancianos y jóvenes, que hubiera sido de gran interés, puesto que tampoco hay estudios al respecto.

No hemos encontrado en la literatura científica ningún trabajo que describa la diferencia en la expresión de la Hsp27 con el envejecimiento. Hay múltiples estudios que apoyan la hipótesis de que aunque la expresión basal de las Hsp no disminuye con la edad, sí lo hace la expresión inducida por el estrés^{1,11,19,21-24} y, así, individuos más ancianos expresarían menos proteínas de choque (sistema antiestrés) en respuesta a un estímulo estresante. Es posible que nuestros resultados, «mayor expresión a mayor edad», se debieran al azar dado el carácter reducido de la muestra, pero las tres comparaciones que relacionan edad y expresión muestran la misma tendencia e, incluso, a pesar del tamaño muestral, una de ellas alcanza la significación estadística, por lo que por lo menos nos invita a realizar estudios más amplios que confirmen o rechacen esta hipótesis. Todo ello teniendo en cuenta como factor estresante la propia patología inflamatoria. Quizá si sometieramos a estas muestras a un nuevo estrés térmico, como en el estudio de Delahye et al²⁶, entonces se eviden-

ciaría una disminución de la inducción de Hsp27 en los individuos de más edad.

El principal punto fuerte del estudio es que por primera vez se analiza no sólo la expresión de la Hsp27 en biopsias hepáticas humanas, sino también su variación con el envejecimiento en el caso concreto de los pacientes con patología hepática inflamatoria.

Entre las limitaciones del estudio, cabe destacar el reducido tamaño muestral al que hemos hecho referencia previamente y la heterogeneidad de la patología, ya que dentro de la patología inflamatoria hay un amplio espectro de diagnósticos que requerirían un análisis por separado de la expresión de Hsp27 para comprobar si hay diferencias, según el diagnóstico. Además, sería conveniente introducir como información sobre la afectación hepática de los pacientes una gradación mediante la escala de Child, de interés pronóstico. Por último, cabe destacar que la técnica inmunohistoquímica utilizada debería de complementarse con otra, el análisis inmunoblot, que resulta más adecuada para realizar la comparación cuantitativa de la expresión de la proteína Hsp27 entre tejidos²⁸, si bien es inapropiado usar el inmunoblot únicamente, ya que su medición se realiza sobre el total de los componentes del tejido, sin permitir la localización precisa de las estructuras expresantes, cosa que sí permite el análisis inmunohistoquímico.

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la proteína de choque Hsp27 se expresa en mayor porcentaje de hepatocitos en los hígados patológicos frente a los normales, tanto en población general como en el grupo de pacientes mayores de 70 años.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gutschmann-Conrad A, Pahlavani MA, Heydari AR. Expression of heat shock protein 70 decreases with age in hepatocytes and splenocytes from female rats. *Mech Ageing Dev.* 1999;107:255-70.
2. Landry J, Chrétien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. Heat shock resistance conferred by expression of the human Hsp27 gene in rodent cells. *J Cell Biol* 1989;109:7-15.
3. Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, Landry J. Induction of Chinese hamster Hsp27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. Hsp27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem.* 1993;268:3420-9.
4. Lindquist S. The heat shock response. *Ann Rev Biochem.* 1986;55:1151-91.
5. Proctor CJ, Soti C, Boys RJ, Gillespie CS, Shanley DP, Wilkinson DJ, et al. Modelling the actions of chaperons and their role in ageing. *Mech Ageing Dev.* 2005;126:119-31.
6. Glass JR, DeWitt RG, Cress AE. Rapid loss of stress fibers in Chinese hamster ovary cells after hyperthermia. *Cancer Res.* 1985;45:258-62.
7. Iida K, Iida H, Yahara I. Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res.* 1986;165:207-15.
8. Laszlo A. The effects of hyperthermia on mammalian cell structure and function. *Cell Prolif.* 1992;25:59-87.

9. Welch WJ, Suhan JP. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton and nucleoli and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J Cell Biol.* 1985;101:1198-211.
10. Gabai VL, Kabakov AE. Tumor cell resistance to energy deprivation and hyperthermia can be determined by the actin skeleton stability. *Cancer Lett.* 1993;70:25-31.
11. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* 2002;92:2177-86.
12. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:433-42.
13. King KL, Li AF, Chau GY, Chi CW, Wu CW, Huang CL, et al. Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. *Cancer.* 2000;88:2464-70.
14. Storm FK, Gilchrist KW, Warner TF, Mahvi DM. Distribution of Hsp27 and HER-2/neu in situ and invasive ductal breast carcinomas. *Ann Surg Oncol.* 1995;2:43-8.
15. Assimakopoulou M. Prognostic significance of Hsp27 in astrocytic brain tumors: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 1997;17:2677-82.
16. Tetu B, Lacasse B, Bouchard HL, Lagace R, Huot J, Landry J. Prognostic influence of Hsp27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 1992;52:2325-8.
17. Shock NW, Greulich RC, Andres R, Arenberg D, Costa PT, Lakatta EG, et al. Normal Human Aging: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. Washington DC: US Government Printing Office; 1984. p. 1-4.
18. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* 1998;30:225-43.
19. Söti C, Csermely P. Aging and molecular chaperons. *Exp Gerontol.* 2003;38:1037-40.
20. Söti C, Pál C, Papp B, Csermely P. Molecular chaperons as regulatory elements of cellular networks. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:210-15.
21. Zhang H, Drake VJ, Morrison JP, Oberley LW, Kregel KC. Differential expression of stress-related genes with aging and hyperthermia. *J Appl Physiol.* 2002;92:1762-69.
22. Hall DM, Xu L, Drake VJ, Oberley LW, Oberley TD, Moseley PL, et al. Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver alter heat stress. *J Appl Physiol.* 2000;89:749-59.
23. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol Cell Biol.* 1993;13:2909-18.
24. Nardai G, Csermely P, Söti C. Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis. *Exp Gerontol.* 2002;37:1257-62.
25. Söti C, Csermely P. Chaperons and aging: their role in neurodegeneration and other civilizational diseases. *Neurochem Int.* 2002;41:383-9.
26. Delahye M, Gulbis B, Galand P, Mairesse N. Expression of 27-kD Heat-shock protein isoforms in human neoplastic and nonneoplastic liver tissues. *Hepatology.* 1992;16:382-9.
27. Ciocca D, Jorge AD, Jorge O, Milutin C, Hosokawa R, Díaz Lestren M, et al. Estrogen receptors, progesterone receptors and Heat-shock 27kD protein in liver biopsy specimens from patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 1991;13:838-44.
28. Lim SO, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Jang KT, et al. Expression of heat shock proteins (HSP70, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol.* 2005;11:2072-9.
29. Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Alessio C, Galdiero M, Finamore E, et al. Heat shock protein 27 expression in patients with chronic liver damage. *Immunobiology.* 2005;209:729-35.
30. Harimoto N, Shimada M, Aishima S, Kitagawa D, Itoh S, Tsujita E, et al. The role of heat shock protein 27 expression in hepatocellular carcinoma in Japan: special reference to the difference between hepatitis B and C. *Liver Int.* 2004;24:316-21.