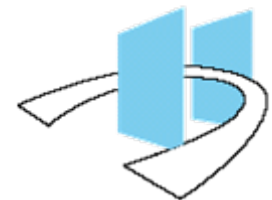


Efectos de la Hipertermia y la Quimioterapia intrapleurales

Bases de su aplicación en el tratamiento de las neoplasias pleurales malignas

Félix Heras Gómez
Servicio de Cirugía Torácica
Hospital Clínico Universitario de Valladolid





Trabajo presentado para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía

Realizado bajo la dirección de

Prof. Dr. D. Guillermo Ramos Seisdedos

Prof. Dr. D. Mariano García-Yuste Martín

**Departamento de Cirugía
Cátedra de Cirugía Torácica
Universidad de Valladolid**

Introducción

Uso combinado de Hipertermia y Quimioterapia*

Tratamiento de procesos oncológicos complejos**

Carcinomatosis pleural

Carcinomatosis peritoneal

Mesotelioma pleural maligno

Limitado a pleura

Tratamiento adyuvante

No limitado a pleura

Control local



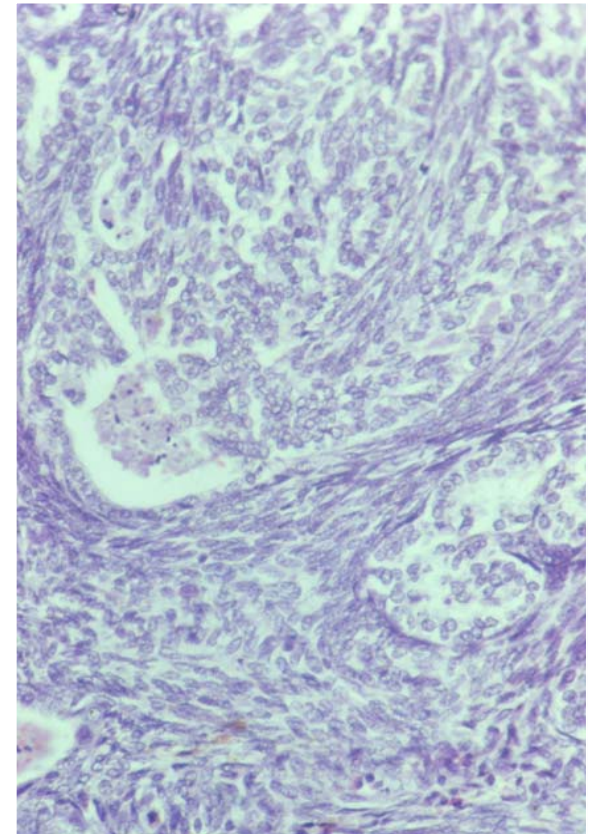
* Van Ruth S. Ann Surg Oncol 2003; 10: 176-182

** De Bree E. Ann Surg Oncol 2008; 15: 1183-1192

Mesotelioma pleural. Diagnóstico y Tratamiento

Factores pronósticos

1. **Correcta estadificación***
TAC, RM, PET, MTS
2. **Pruebas anatomopatológicas específicas****
3. **Neumonectomía extrapleural extendida / pleurectomía***
4. **Tratamiento adyuvante intra y postoperatorio***



* Sugarbaker DJ. J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 117: 54-65

** Beyer HL. Clin Chem 2007; 53: 666-672

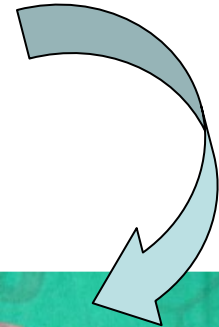
Mesotelioma pleural. Tratamiento multimodal

Estadios I y II

1. Neumonectomía extrapleural extendida*

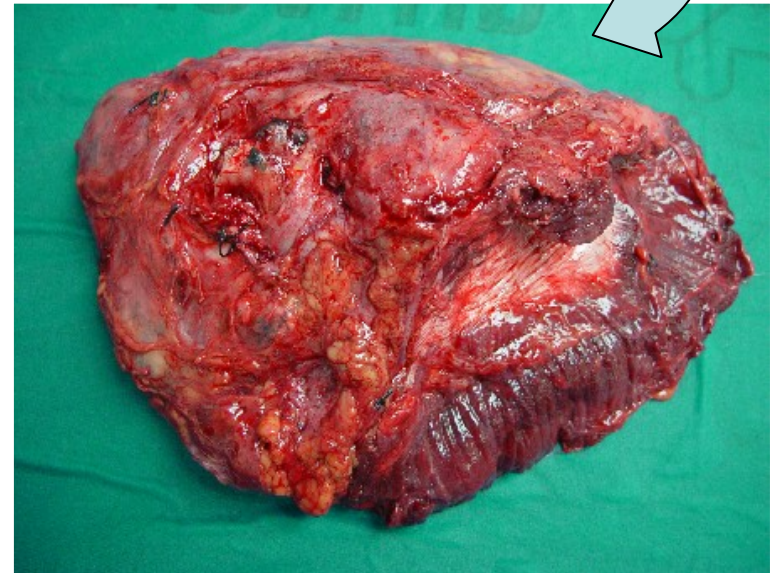
disección ganglionar mediastínica

resección diafragma homolateral y pericardio



2. Tratamiento adyuvante**

intra y postoperatorio



* Chang MY. Thorac Surg Clin 2004; 14: 533-530

** Pinto C. Lung Cancer 2006; 52: 199-206

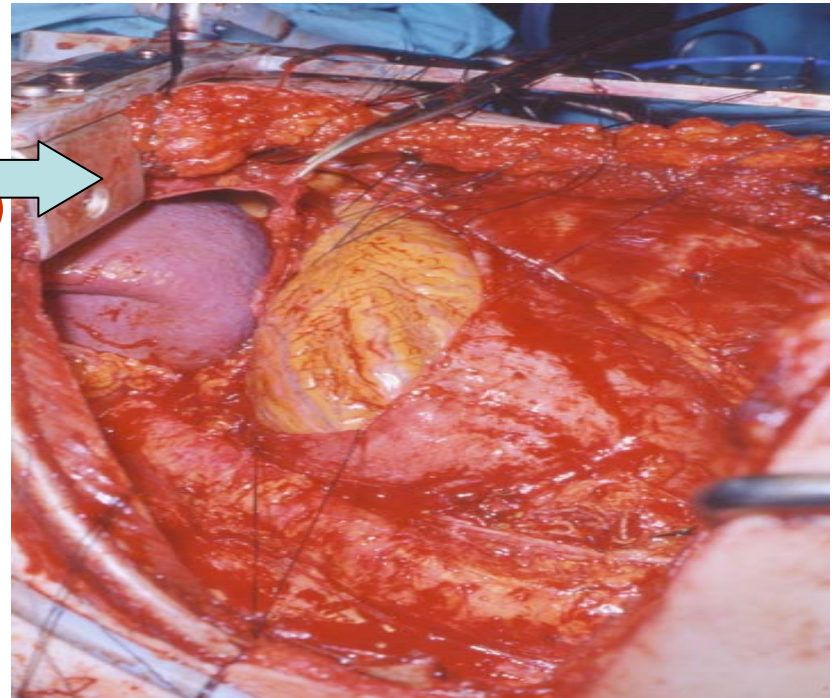
Mesotelioma pleural. Tratamiento multimodal*

Estadios I y II

1. Neumonectomía extrapleural extendida

2. Tratamiento adyuvante

- QT intraoperatoria
Intrapleural hipertérmica
- QT postoperatoria
Ifosfamida, carboplatino
- RT postoperatoria 50 Gy



* Rea F. Lung Cancer 2007; 57: 89-95

* Flores RM. J Thorac Oncol 2006; 1: 289-295

Uso combinado de Hipertermia y Quimioterapia

Fundamentos de su aplicación

1. La Quimioterapia intrapleural consigue altos niveles locales con tolerable absorción sistémica*
2. La Hipertermia puede mejorar la efectividad de la Quimioterapia**

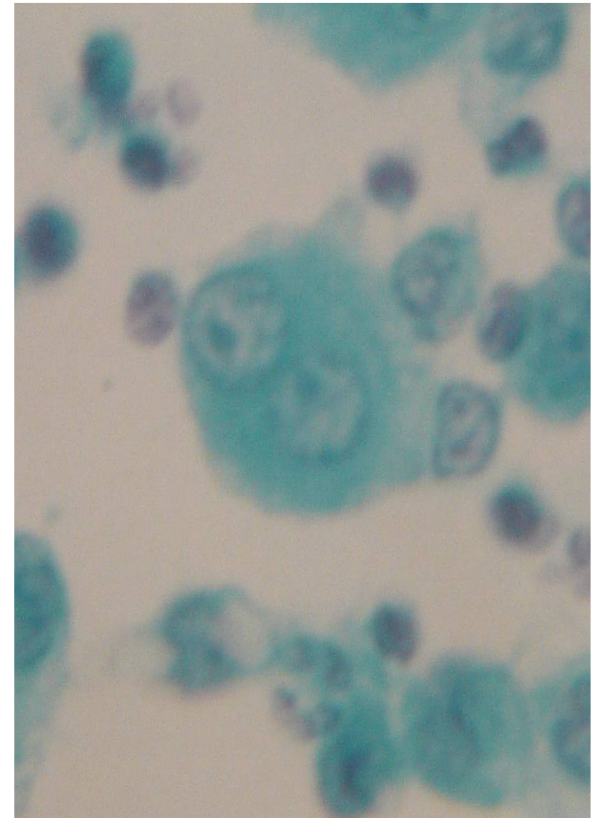
* Chang MY. Thorac Surg Clin 2004; 14: 549-556

** Smythe WR. Ann Surg Oncol 2003; 10: 210-212

Uso combinado de Hipertermia y Quimioterapia

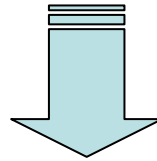
Posibles mecanismos de acción*

1. Interacción en la síntesis de ADN
2. Alteración permeabilidad de la membrana celular
3. Efectos sobre la función del citoesqueleto
4. Producción de apoptosis celular

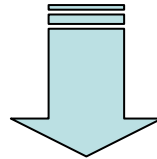


* Christophi C. Surg Oncol 1998; 7: 83-90

Uso combinado de Hipertermia y QT intrapleurales



resulta empírico



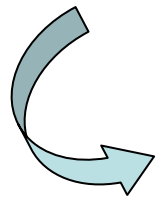
Los mecanismos de actuación no están claramente definidos

Uso combinado de Hipertermia y QT intrapleurales

Bases de su planteamiento*

1. Funciones celulares

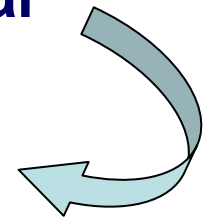
proliferación, diferenciación, mantenimiento y muerte



Controladas por genes y vías de señalización

2. Apoptosis, angiogénesis e interacción celular

Reguladas por citocinas



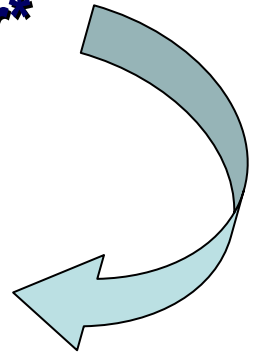
* Potian JA. J Immunol 2003; 171: 3426-3434

Uso combinado de Hipertermia y QT intrapleurales

El estudio de algunas proteínas proinflamatorias (citocinas) permite valorar la respuesta celular*

Interesa establecer relación entre

- 1. Nivel de expresión de proteínas proinflamatorias**
- 2. Apoptosis y necrosis celular**



* Galffy G. Oncol Res 1999; 11: 187-194

Hipótesis de trabajo

Hipótesis de trabajo

1. Determinar en las células pleurales murinas la respuesta proinflamatoria inducida por la hipertermia mediante el análisis de:

Expresión de proteínas proinflamatorias

Producción de apoptosis y necrosis celular

2. Precisar la modificación de esta respuesta tras la administración de cisplatino en diferentes condiciones de temperatura

Material y métodos

Instrumentación

Laboratorio de Cirugía Experimental

- 1. Quirófano de Cirugía experimental**
- 2. Material fungible de acuerdo con la metodología**
- 3. Animalario. Homologado según normas de la UE**
- 4. Cumplimiento normativa protección animales experimentación**

RD 223/1998 (BOE 18 marzo 1998)

RO 13 octubre 1989 (BOE 18 octubre 1998)

RD 1201/2005, 10 de octubre 2005

Instrumentación

Laboratorio de Biología y Genética Molecular

- 1. Dotación técnica para la realización de cultivos celulares**
- 2. Medios para la realización de análisis múltiple de la expresión celular de proteínas proinflamatorias**
- 3. Citometría de flujo y medios complementarios para investigar la producción de apoptosis y necrosis celular**
- 4. Material fungible necesario para la realización de las técnicas expuestas en la metodología**

Diseño experimental

Animales de experimentación

Ratones albinos machos raza Swiss OF1

Oncis, France cepa 1

Procedencia: Introducción CF1 (Carworth farms cepa 1) en Charles River Laboratories, France, 1996

Eutímicos e inmunocompetentes

Edad: 6 semanas

Peso: 40 - 50 gramos

nº total animales: **90 ratones**

6 grupos de 15 animales por experimento

Diseño experimental

Obtención de células pleurales

Procedimiento anestésico

Administración intramuscular de

Pentobarbital Sódico 0,5 mg / 100 gr.

Bromuro de Pancuronio 0,1 mg / 100 gr.



Inducción farmacológica de parada cardiorrespiratoria

Diseño experimental

Obtención de células pleurales

Procedimiento quirúrgico

Incisión cutánea de esternolaparotomía media

Apertura de la línea media abdominal y del peritoneo parietal

Visualización y comprobación de la integridad de ambos diafragmas



Diseño experimental

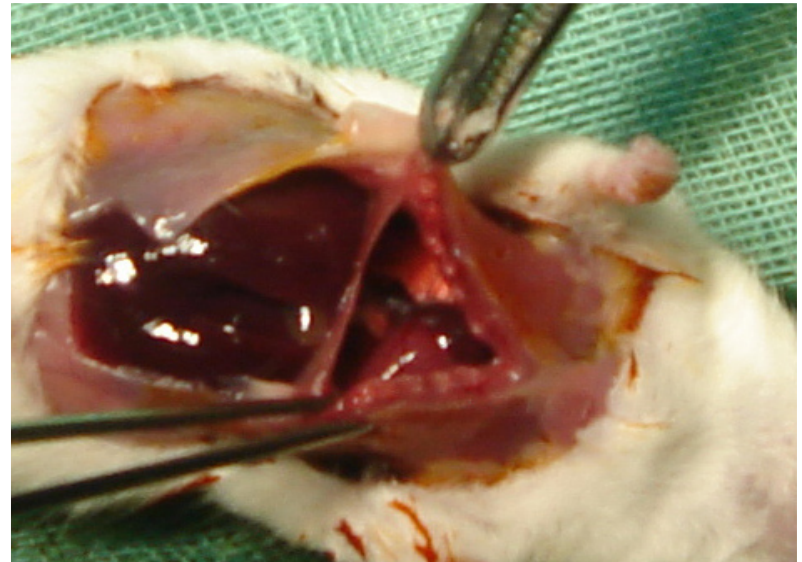
Obtención de células pleurales

Procedimiento quirúrgico

Apertura por incisión
paraesternal de la cavidad
pleural derecha

Comprobación de:

- Integridad del hemidiafragma derecho
- Ausencia de restos hemáticos
- Ausencia de procesos patológicos pleuropulmonares

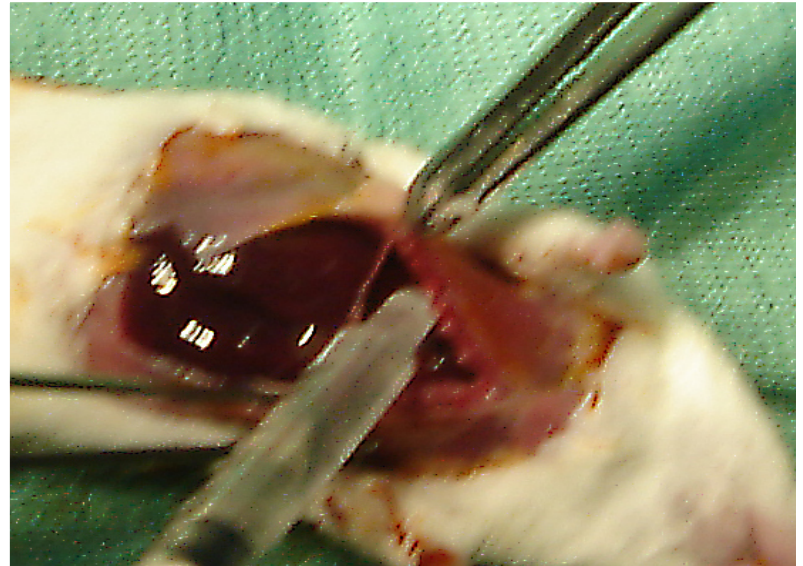


Diseño experimental

Obtención de células pleurales

Procedimiento quirúrgico

Instilación en la cavidad pleural de suero fisiológico tamponado con fosfato, PBS 0,15 M



(CINa 8 g/l; ClK 0,2 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,44 g/l; KH_2PO_4 0,2 g/l)

Lavado de la cavidad con tampón fosfato salino durante 2 minutos

Diseño experimental

Obtención de células pleurales

Procedimiento quirúrgico

Maniobras mecánicas de agitación para facilitar la descamación de células mesoteliales pleurales

Aspiración del líquido acumulado en la cavidad pleural

Recogida del líquido en medio de transporte estéril



Diseño experimental

Recogida de células pleurales

Resuspensión de células pleurales en DMEM

(Dulbecco's Modified Eagles Medium sin L-glutamina y rojo de fenol)

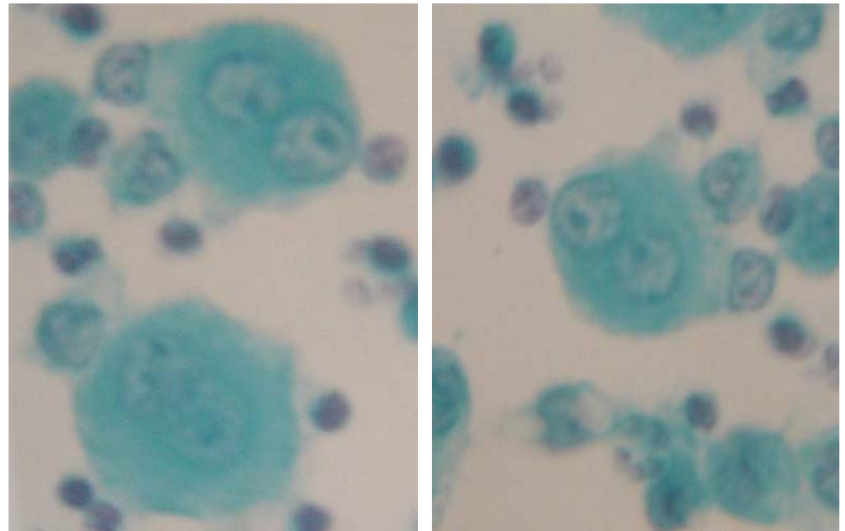
Suplementada con:

100 U/ml de penicilina

100 μ gr/ml de estreptomina

50 μ gr/ml de gentamicina

2 mM de glutamina



Diseño experimental

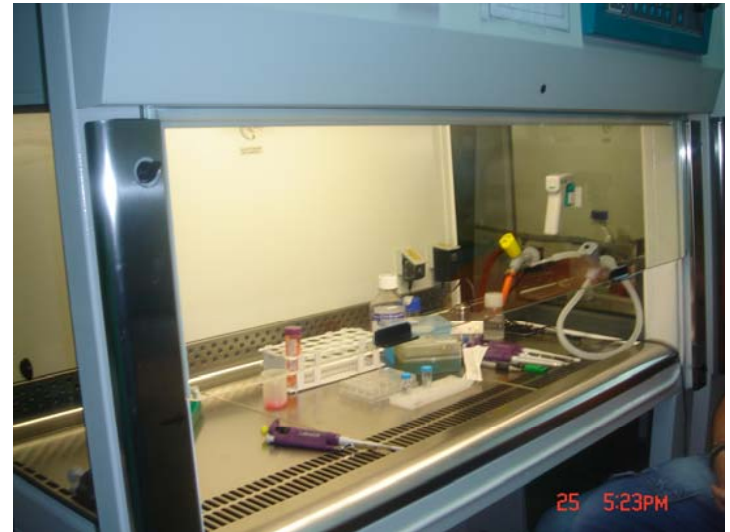
Recogida de células pleurales

Retirada a las 2 horas de las células no adheridas después de adherencia a 37 °C

Comprobación de adherencia celular
adhesión a partículas de zymosan

Tinción con estearasa no específica

Obtención de **16 a 20 millones de células** en cada experiencia



Grupos de estudio

Cultivo de células pleurales durante 2 horas

- Sin modificación farmacológica

- 1.- En condiciones normotérmicas de 37 °C
- 2.- Sometidas a choque térmico de 40 °C
- 3.- Sometidas a choque térmico de 42 °C

- Tratamiento citostático con cisplatino (33,7 µg/ml)

- 1.- En condiciones normotérmicas de 37 °C
- 2.- Sometidas a choque térmico de 40 °C
- 3.- Sometidas a choque térmico de 42 °C

Grupos de estudio

Determinaciones en cada grupo

- **Proteínas proinflamatorias en el sobrenadante del cultivo celular**

RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc.

- **Apoptosis celular**

Detección en la superficie de fosfatidilserina con Anexina V-FICT (kit de detección de apoptosis de Pharmingen)

- **Necrosis celular**

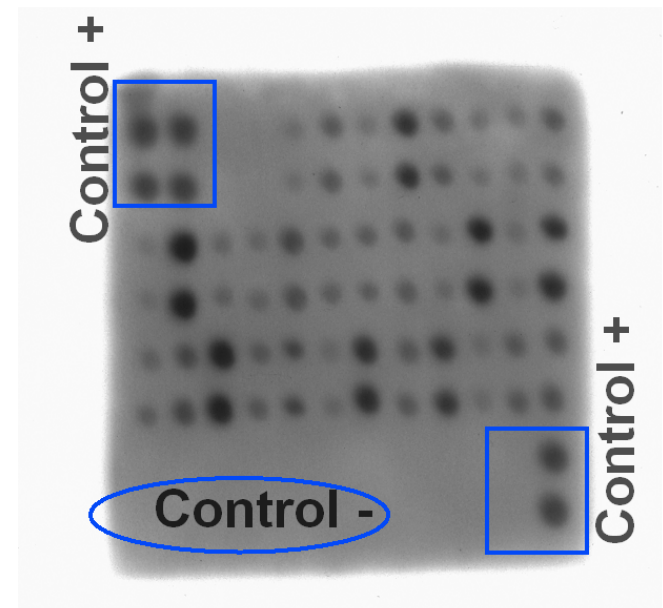
Tinción con Ioduro de Propidio

Determinación de proteínas proinflamatorias

Elección del sistema de determinación

RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II RayBiotech Inc.

- diseñado especialmente para medios de cultivo
- contiene las proteínas de más relevancia fisiopatológica



Determinación de proteínas proinflamatorias

RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc.

IL-8 Quimiotáctica para polimorfonucleares

(KC en ratón)

sTNFR Factor de necrosis tumoral. Proinflamatoria

MIP-2 Responsable de migración de neutrófilos

G-CSF Estimula colonias de granulocitos

IL-10 Activa células “asesinas” y células T

RANTES Pone en marcha inflamación modulada por células T

MCP-1 Quimiotáctica de linfocitos

MCP-5 Atrayente de monocitos y macrófagos

MIP-1 Actua sobre fagocitos mononucleares y macrófagos

TIMP-1 Inhibidora de colagenasa degradadora matriz extracelular

IL-6 Activa señalización de superficie celular

PMN

Linfocitos T

Macrófagos

Determinación de proteínas proinflamatorias

Detección de señales. Análisis de datos y gráficas

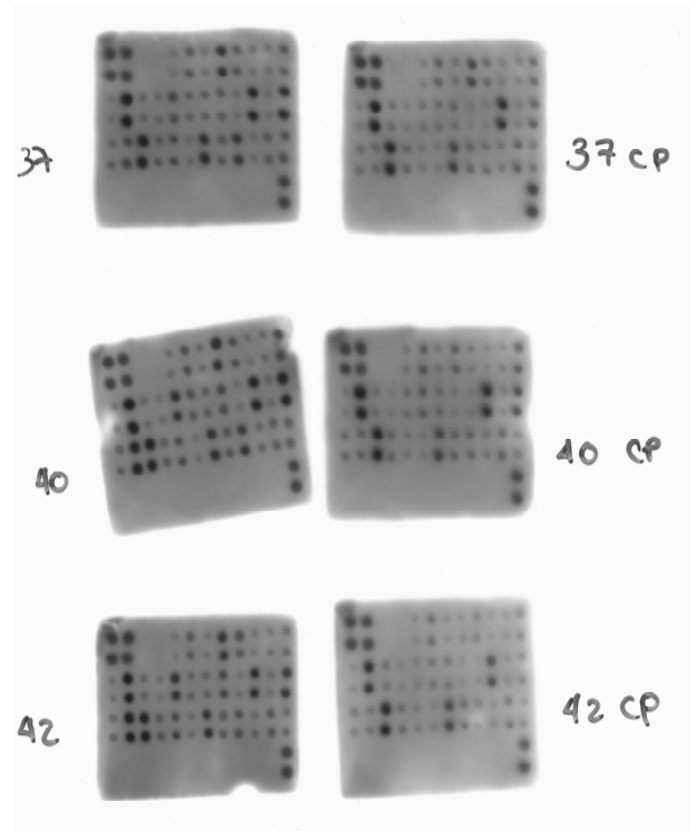
Utilización sistema Amersham
Enhanced Chemiluminescence

Películas autorradiográficas
escaneadas por transparencia

Densitómetro BioRad (Hercules, CA)
Software Quantity One ®

Cuantificación de blots con
controles positivos de membrana

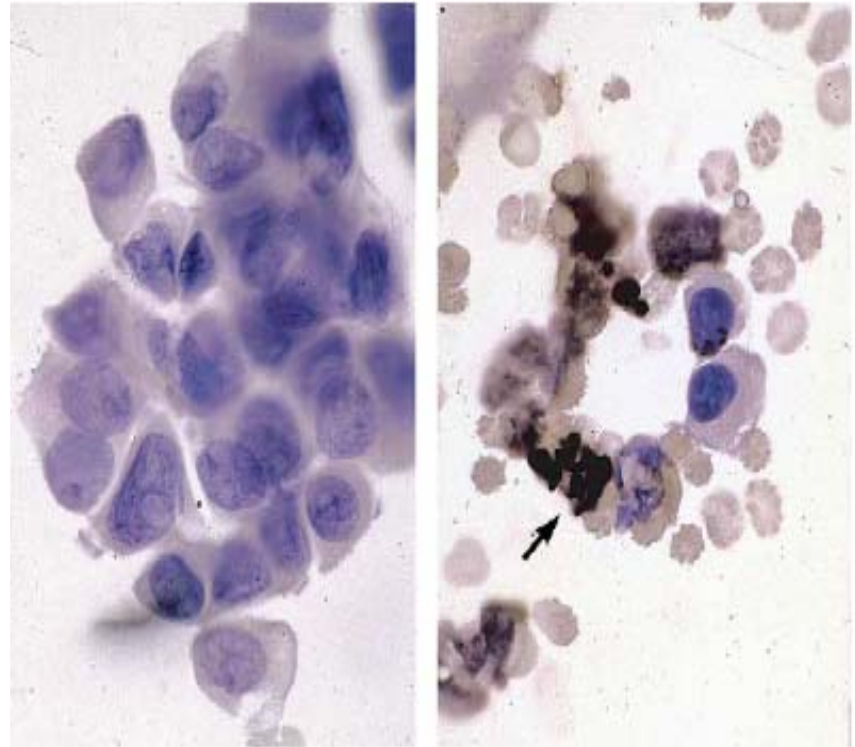
**Positividad: incremento del doble
de la densidad basal**



Determinación de apoptosis y necrosis celular

Anexina V-FITC y Ioduro de Propidio

1. Adición de 2 μ l de Anexina y 2 μ l de Ioduro de Propidio (1mg/ml)
2. Incubación en oscuridad durante 15 minutos
3. Adición de 400 μ l de buffer de unión a cada tubo y análisis inmediato por citometría de flujo



Determinación de apoptosis y necrosis celular

Análisis de las muestras

FACScan

Programa Cellquest (Becton Dickinson)

Células en apoptosis

Anexina	+
Ioduro de Propidio	-

Células necrosadas

Anexina	±
Ioduro de Propidio	+

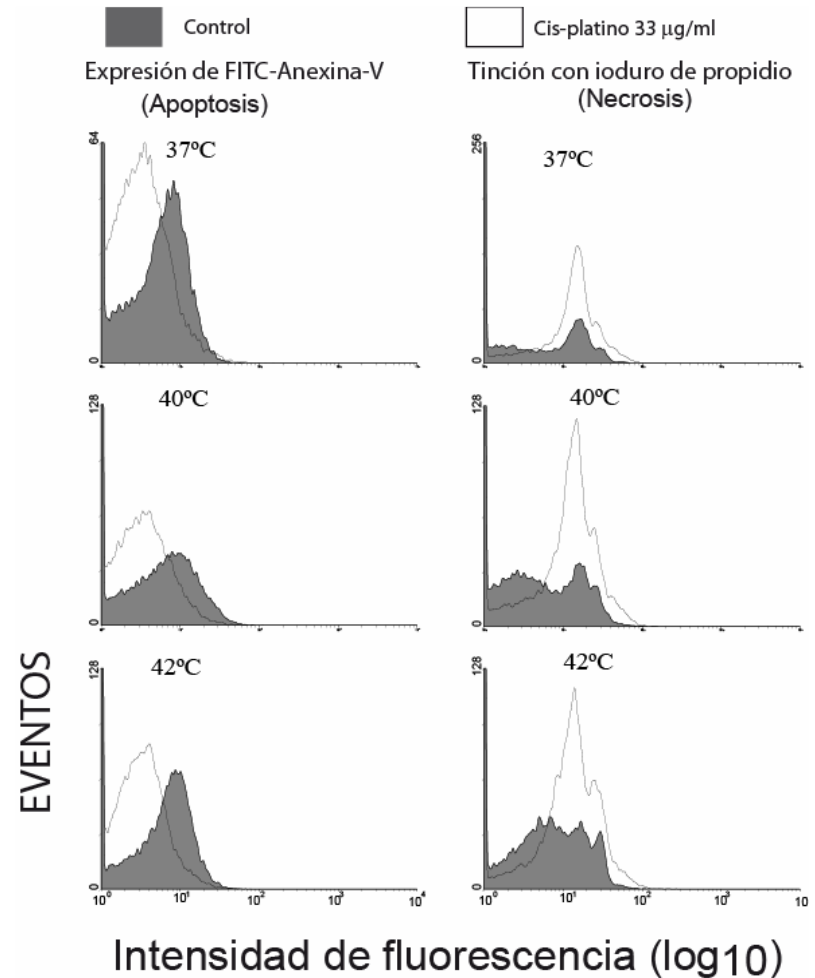


Determinación de apoptosis y necrosis celular

Análisis de las muestras

1. Expresión porcentual de apoptosis y necrosis en cada grupo
2. Dinámica de expresión de la producción de apoptosis y necrosis

(relación entre intensidad de fluorescencia (log 10) y n° de eventos)



Tratamiento estadístico (SPSS 12.0)

Pruebas estadísticas no paramétricas

1. Análisis de medias de dos muestras aleatorias independientes:

Test de la U de Mann-Whitney

2. Comparación de más de 2 muestras independientes

Prueba H de suma de rangos de Kruskal-Wallis

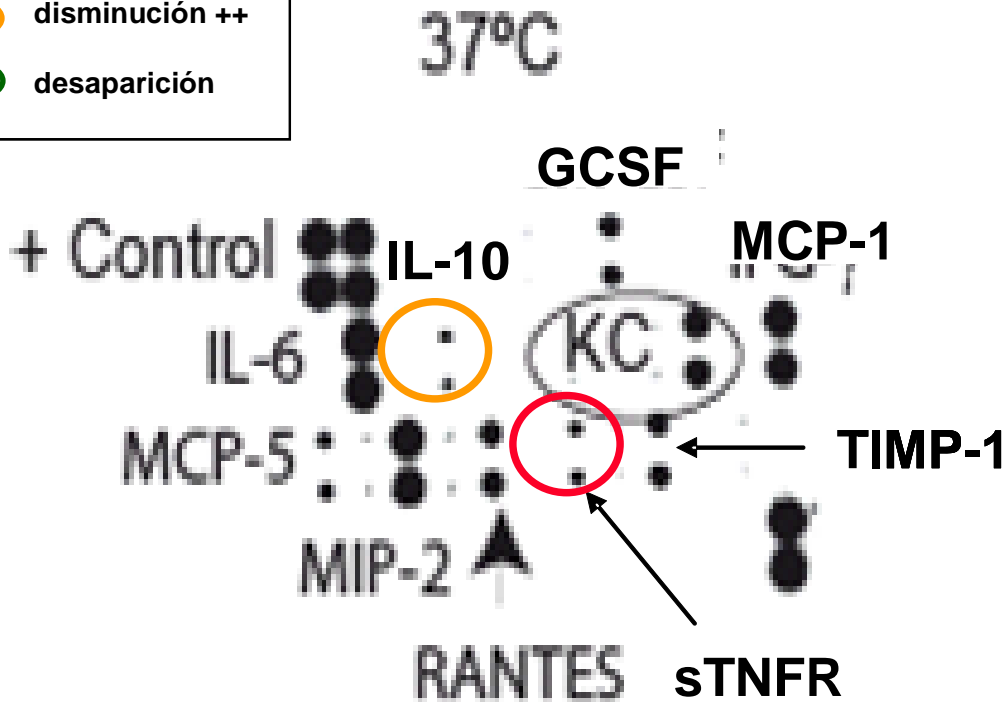
3. Significación estadística $p < 0,05$

Resultados

Síntesis de proteínas proinflamatorias

Síntesis de proteínas proinflamatorias

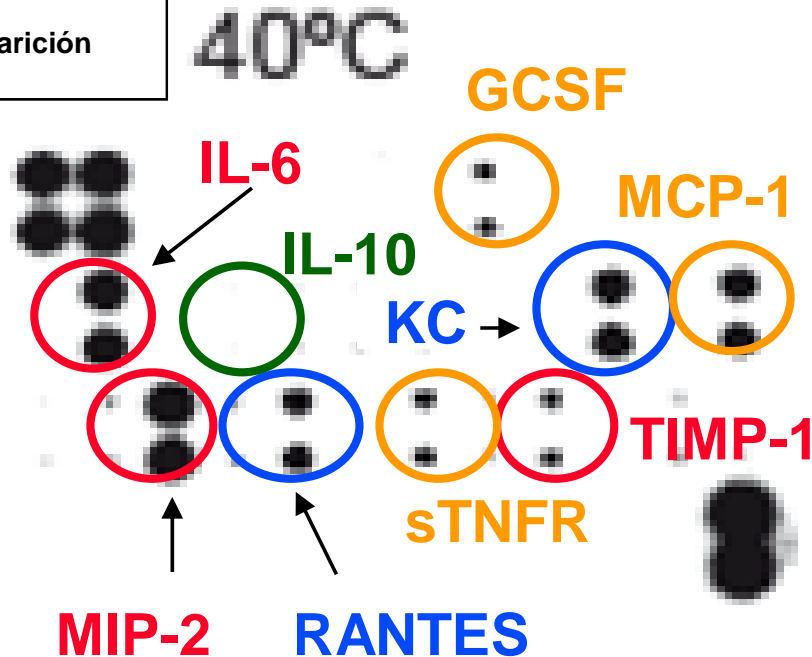
Modulación por la temperatura (37 °C)



Citocinas	37 °C
IL-6	100
MIP-2	100
G-CSF	100
IL-10	40
KC	100
MCP-1	100
MCP-5	100
RANTES	100
TIMP-1	100
sTNF-R	70

Síntesis de proteínas proinflamatorias

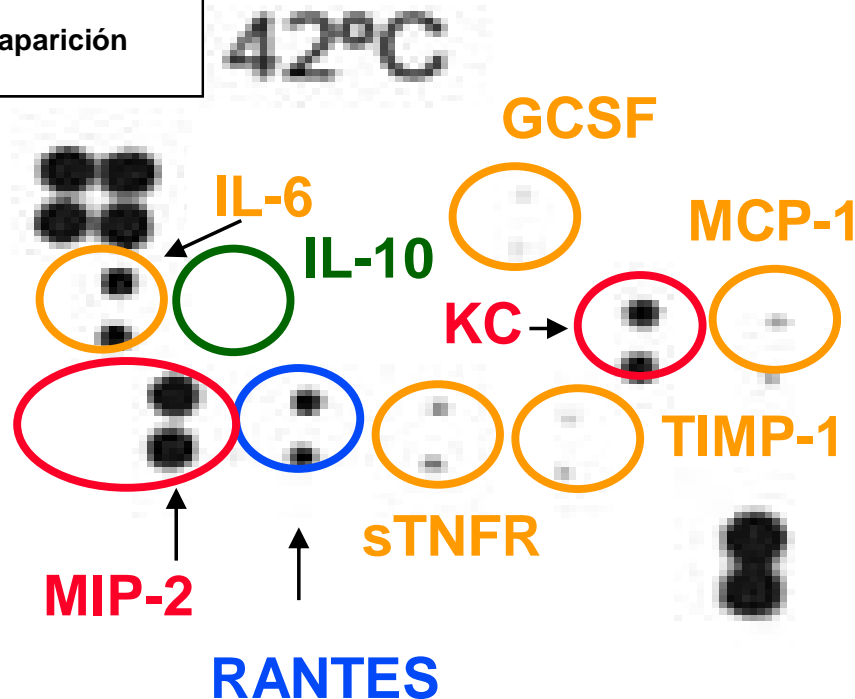
Modulación por la temperatura (40 °C)



Citocinas	40 °C
IL-6	80
MIP-2	90
G-CSF	30
IL-10	--
KC	100
MCP-1	45
MCP-5	90
RANTES	100
TIMP-1	75
sTNF-R	40

Síntesis de proteínas proinflamatorias

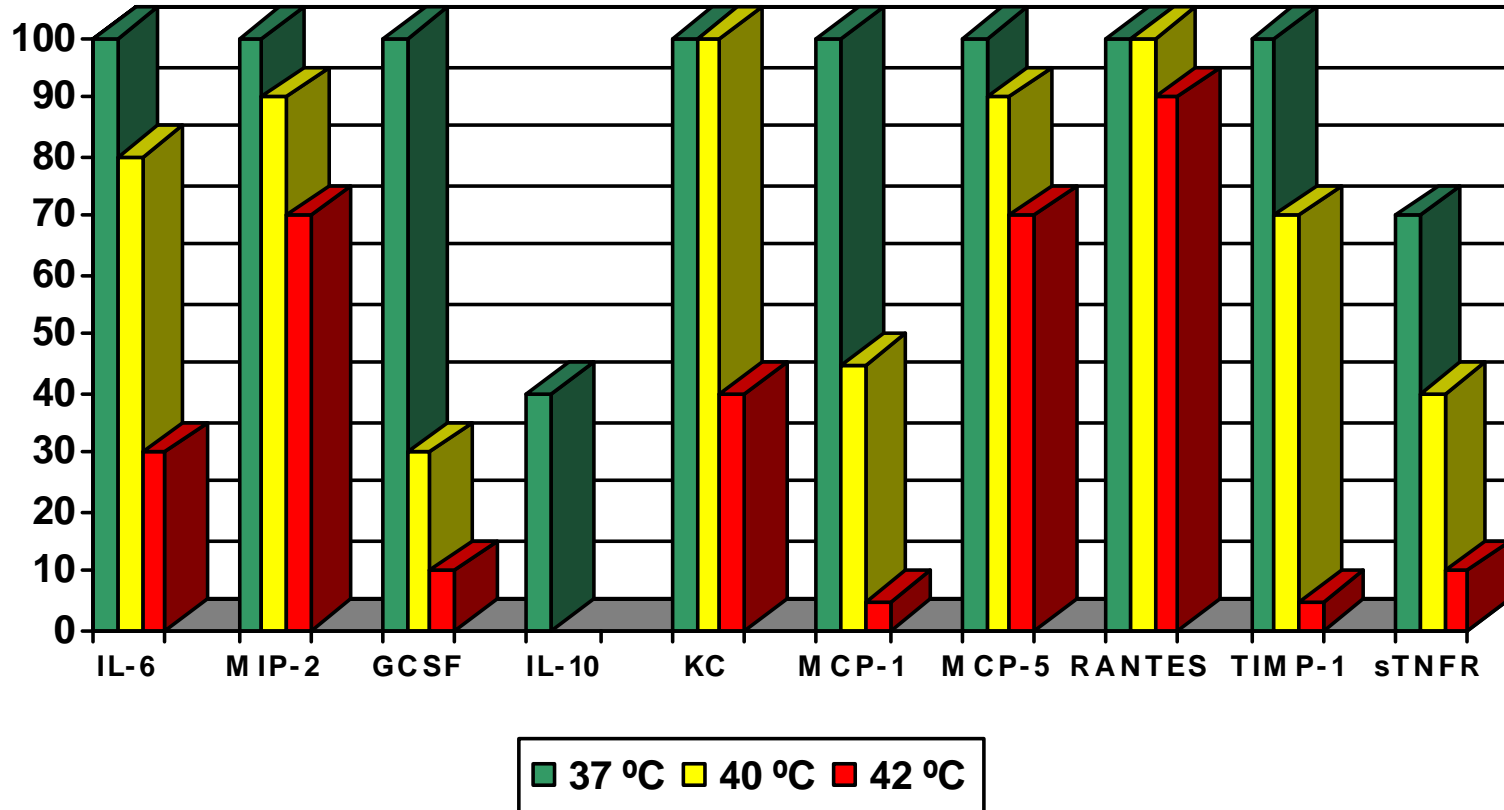
Modulación por la temperatura (42 °C)



Citocinas	42 °C
IL-6	30
MIP-2	70
G-CSF	30
IL-10	--
KC	40
MCP-1	5
MCP-5	70
RANTES	90
TIMP-1	5
sTNF-R	10

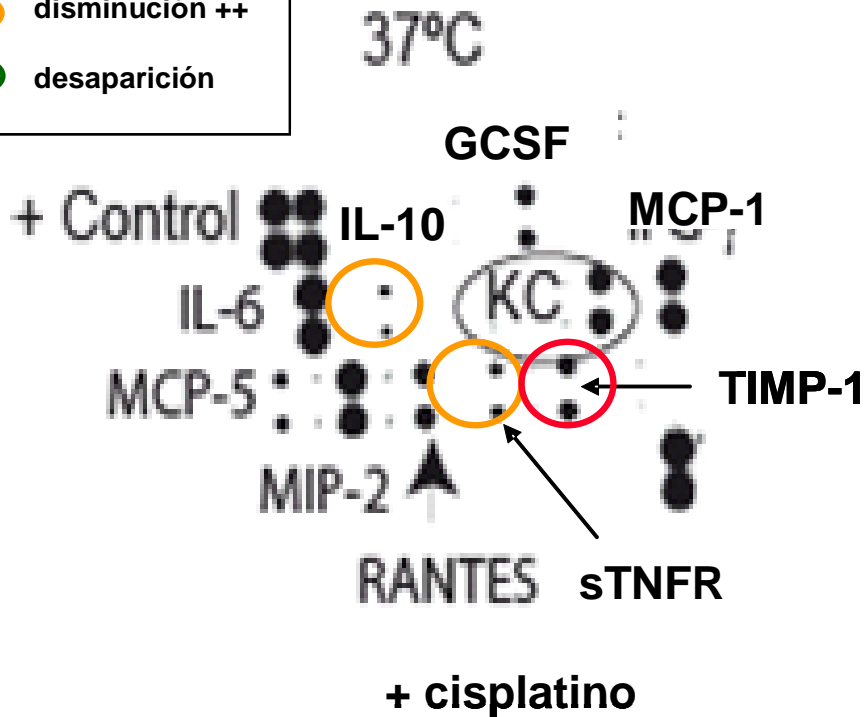
Síntesis de proteínas proinflamatorias

Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C)



Síntesis de proteínas proinflamatorias

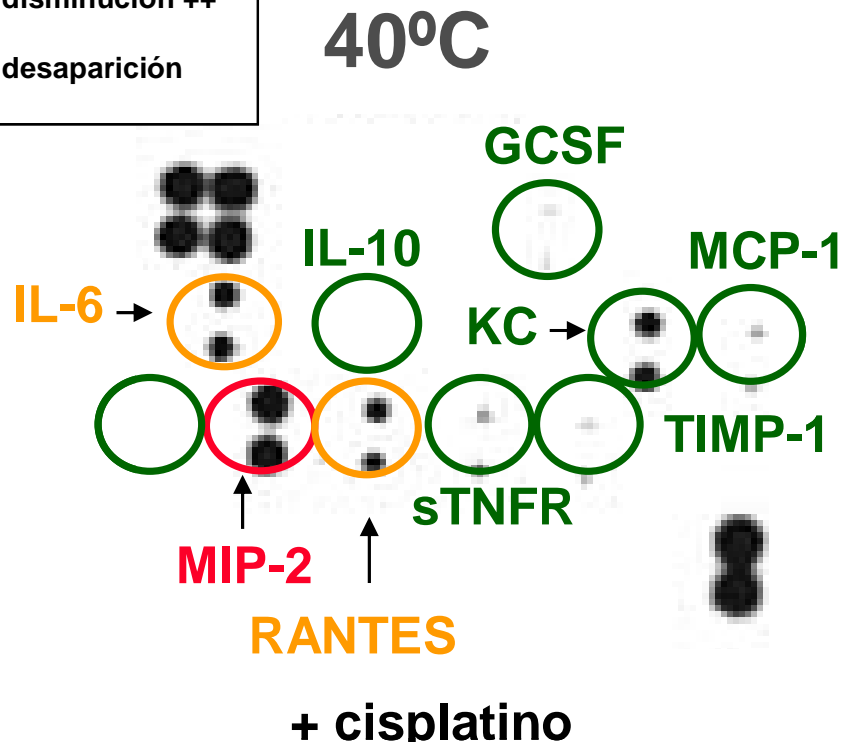
Modulación por la temperatura (37 °C) y cisplatino (33,7 µg/ml)



Citocinas	37 °C
IL-6	100
MIP-2	100
G-CSF	100
IL-10	40
KC	100
MCP-1	100
MCP-5	100
RANTES	100
TIMP-1	70
sTNF-R	50

Síntesis de proteínas proinflamatorias

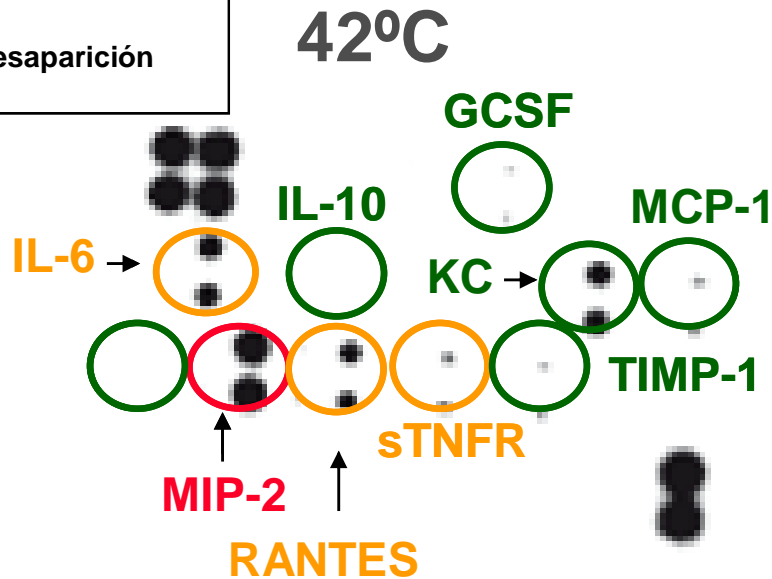
Modulación por la temperatura (40 °C) y cisplatino (33,7 µg/ml)



Citocinas	40 °C
IL-6	30
MIP-2	40
G-CSF	5
IL-10	--
KC	5
MCP-1	--
MCP-5	--
RANTES	10
TIMP-1	5
sTNF-R	5

Síntesis de proteínas proinflamatorias

Modulación por la temperatura (42 °C) y cisplatino (33,7 µg/ml)

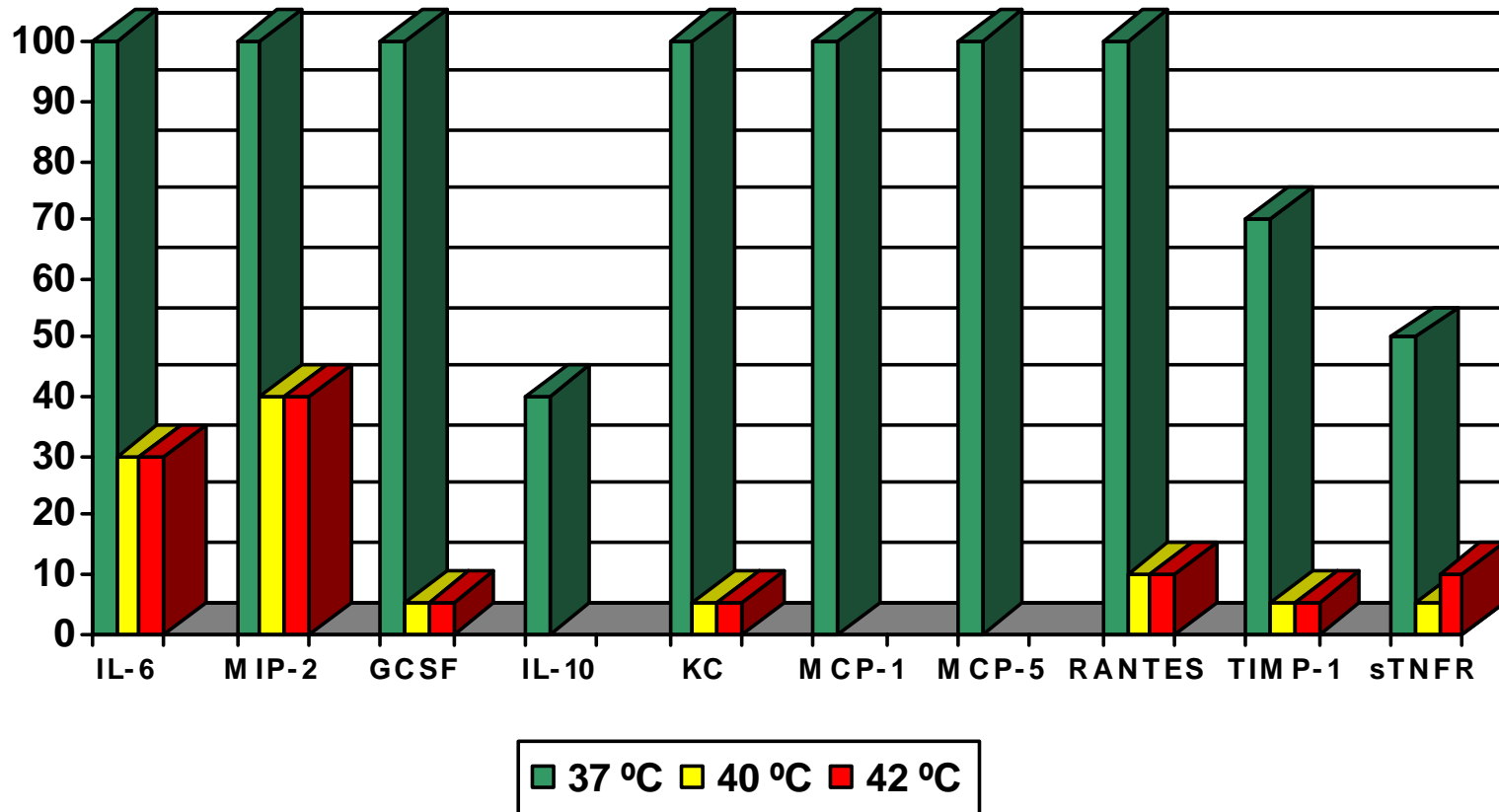


+ cisplatino

Citocinas	42 °C
IL-6	30
MIP-2	40
G-CSF	5
IL-10	--
KC	5
MCP-1	--
MCP-5	--
RANTES	10
TIMP-1	5
sTNF-R	10

Síntesis de proteínas proinflamatorias

Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C) y cisplatino (33,7 µg/ml)



Síntesis de proteínas proinflamatorias

Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C)

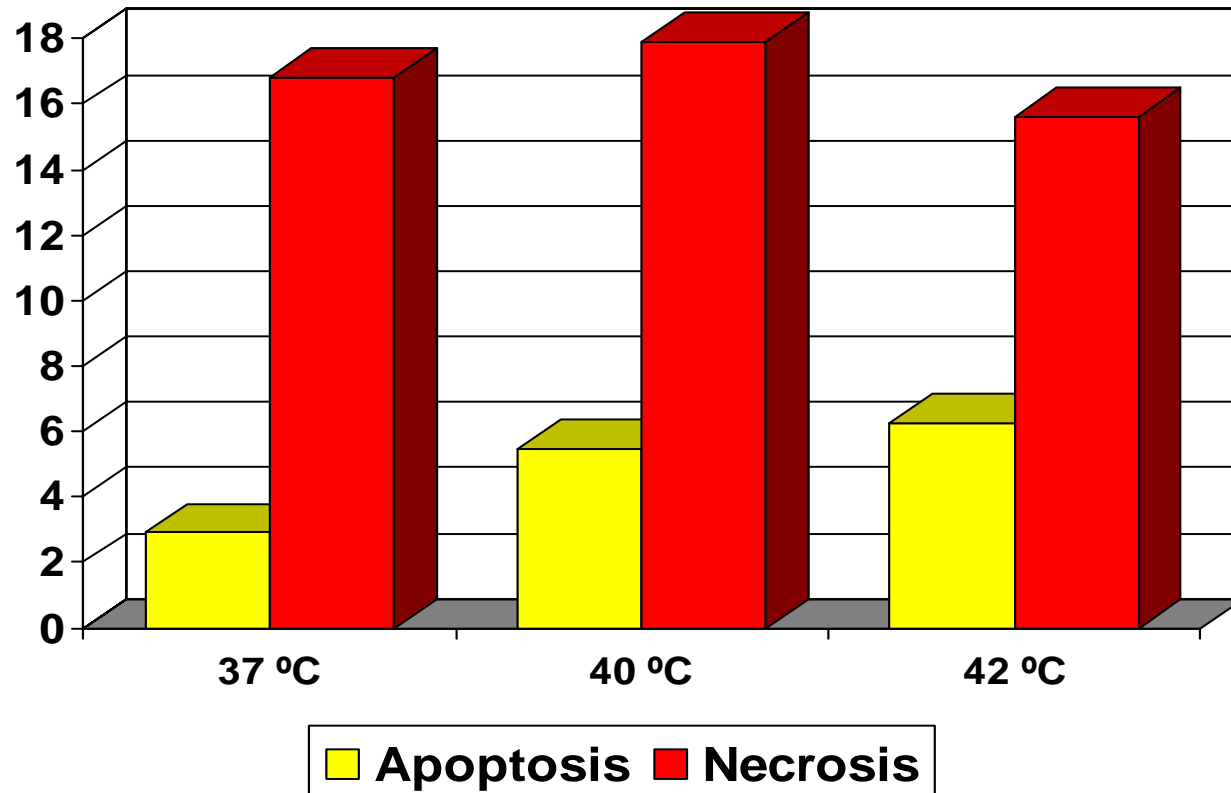
Temperatura	KC	RANTES	G-CSF	MIP-2	IL-6	IL-10	sTNF-R
37 °C	100	100	100	100	100	40	70
40 °C	100	100	30	90	80	--	40
42 °C	40	90	30	70	30	--	10
p(37/42 °C)	0,005	0,005	0,006	0,006	0,006	0,001	0,001

Resultados

Apoptosis y necrosis celular

Apoptosis y necrosis de las células pleurales

Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C)



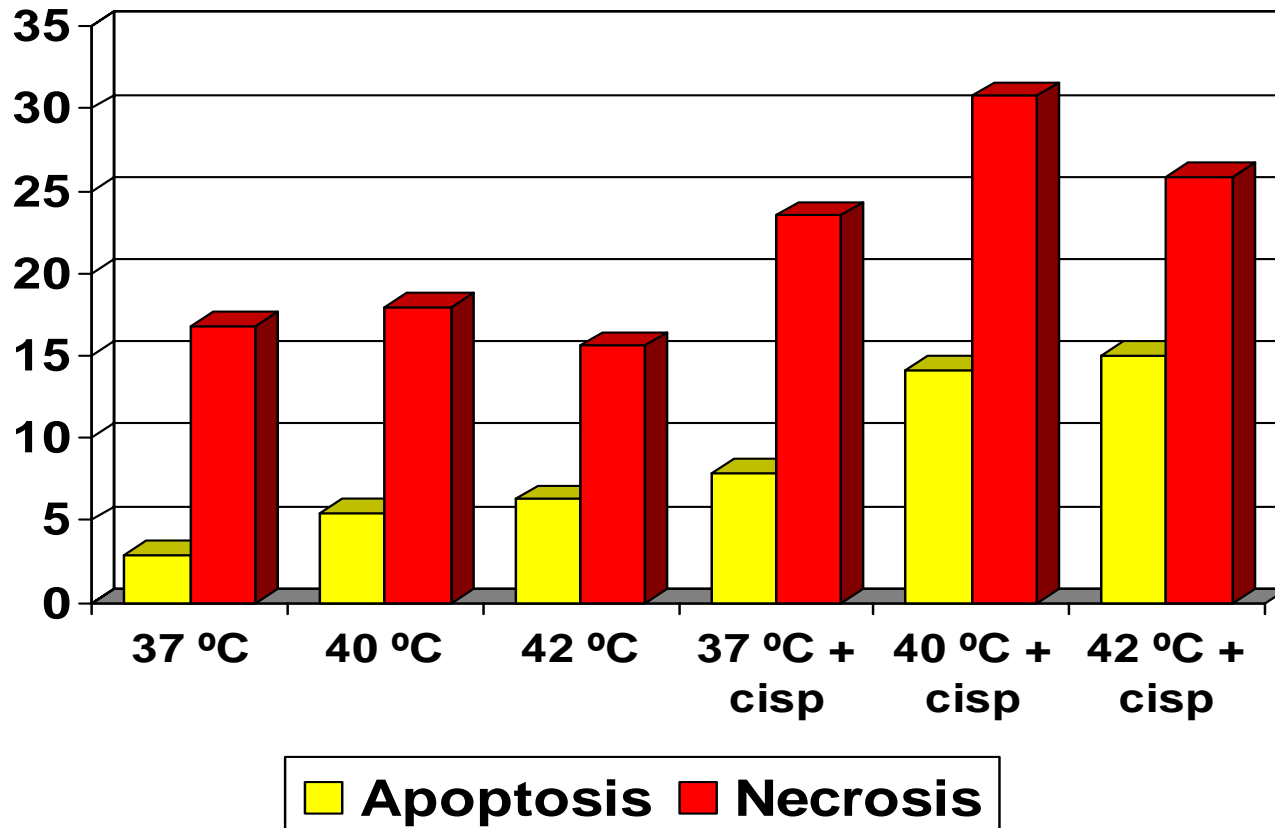
Apoptosis y necrosis de las células pleurales

Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C)

Temperatura	Apoptosis	Necrosis
37 °C	2,90	16,81
40 °C	5,46	17,90
42 °C	6,27	15,59
p(37/42 °C)	0,041	0,762

Apoptosis y necrosis de las células pleurales

Modulación por temperatura (37, 40 y 42 °C) sin y con cisplatino (33,7 µg/ml)



Apoptosis de las células pleurales

Modulación por temperatura (37, 40 y 42 °C) sin y con cisplatino (33,7 µg/ml)

Temperatura	Apoptosis	Apoptosis		
	T	T+CP (33,7 µg/ml)	% Incremento	p
37 °C	2,90	7,86	271	0,347
40 °C	5,46	14,10	258	0,117
42 °C	6,27	15,05	240	0,347

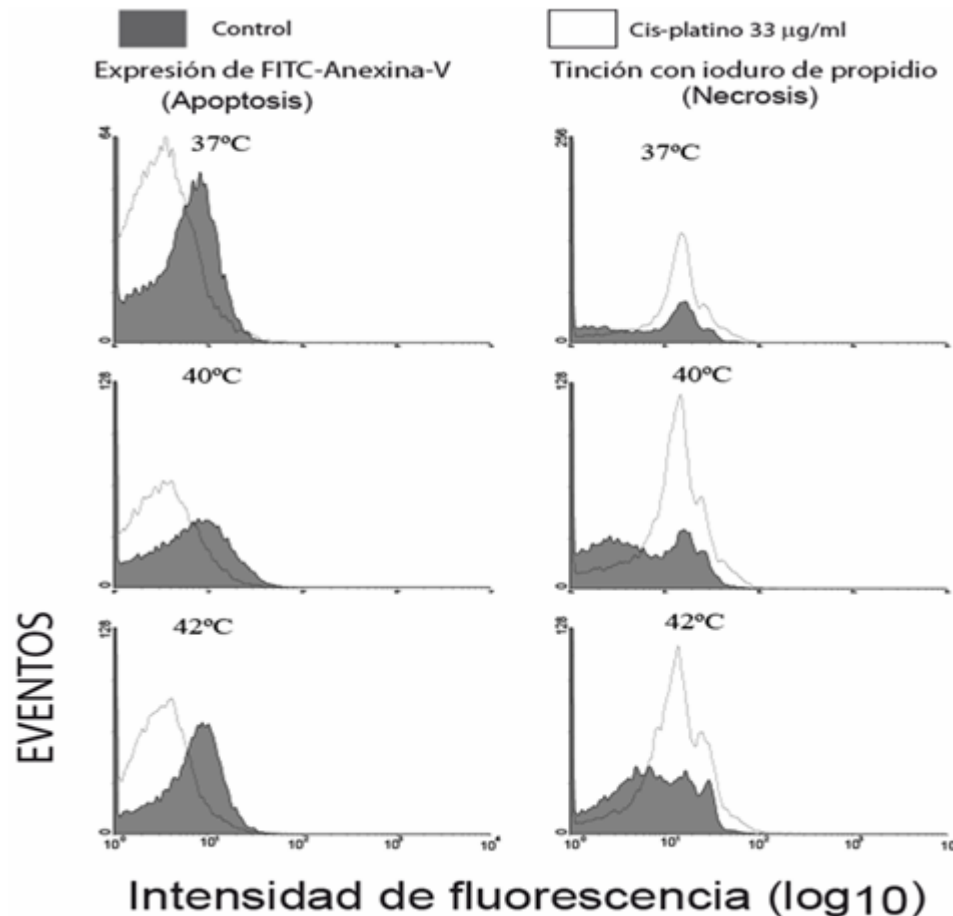
Necrosis de las células pleurales

Modulación por temperatura (37, 40 y 42 °C) sin y con cisplatino (33,7 µg/ml)

Temperatura	Necrosis	Necrosis		
	T	T+CP (33,7 µg/ml)	% Incremento	p
37 °C	16,81	23,49	139	0,251
40 °C	17,90	30,77	172	0,117
42 °C	15,59	25,82	166	0,117

Apoptosis y necrosis de las células pleurales

Modulación por temperatura (37, 40 y 42 °C) sin y con cisplatino (33,7 µg/ml)



Discusión de los resultados

1. ¿Es necesaria la investigación de nuevos modelos terapéuticos para las neoplasias pleurales malignas?

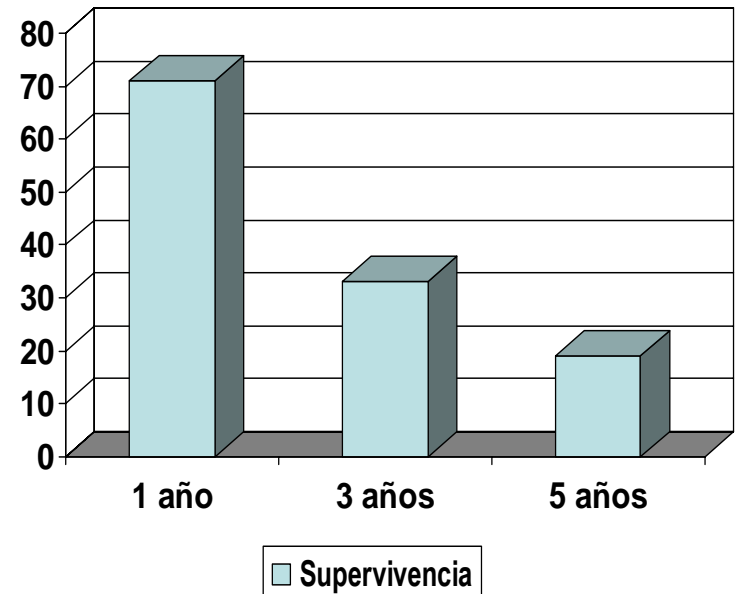
Mesotelioma → prototipo de las neoplasias pleurales

Incremento progresivo de incidencia hasta el año 2020
Uso de asbesto y largo periodo de latencia

Tratamiento multimodal
Cirugía, QT, RT*

QT hipertérmica intrapleural**

Pobre respuesta
Supervivencia media 25 meses



* Rea F. Lung Cancer 2007; 57: 89-95

** Richards WG. J Clin Oncol 2006; 24: 1561-1567

Mesotelioma presenta resistencia a la apoptosis*

1. Vía extrínseca o de receptores de muerte de membrana

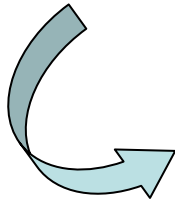


Genes del receptor TNF
(Tumor Necrosis Factor)

2. Vía intrínseca o mitocondrial



Proteínas Bcl-2

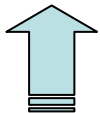


Proapoptóticas

Bid, Bad, Bim, Bik, Bax y Bak

Antiapoptóticas

Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w y Mcl-1



Expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-XL y Bcl-2



Quimiorresistencia del tumor**

* Hanahan D. Cell 2000; 100: 57-70

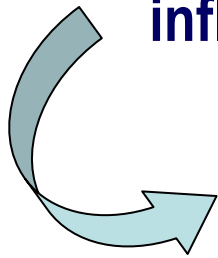
** Sartorius UA. Int J Cancer 2002; 97: 584-592

Apoptosis y necrosis celular

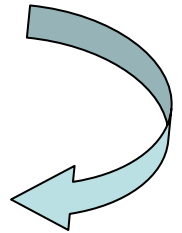
controladas por citocinas*

Proteínas proinflamatorias

influyen en la respuesta de las células mesoteliales a la QT



Detección simultánea de los niveles de expresión de distintas citocinas**



Establecer la relación entre la expresión de citocinas y la producción de muerte celular

* Potian JA. J Immunol 2003; 171: 3426-3434

** Celis JE. Mol Cell Proteomics 2004; 3: 327-344

2.- ¿Cuál es el modelo experimental idóneo para intentar dar respuesta al problema planteado?

La investigación se realiza habitualmente sobre modelo animal

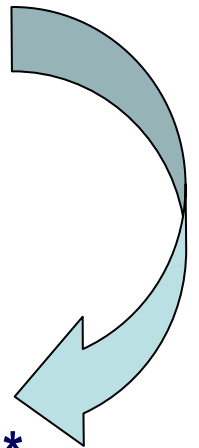
El ratón común (*Mus musculus*) es el animal más utilizado

corto periodo gestacional

abundancia de crías

facilidad de manejo

Gran similitud del genoma del ratón con el genoma humano*



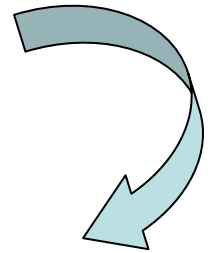
* Mouse Genome Sequencing Consortium. Nature 2002; 420: 520-562

Semejanza de ambos genomas*

80% de genes equivalentes con homología de 70 a 100%

70% de aminoácidos idénticos con similar secuencia

Permite estudiar la evolución de las proteínas ortólogas



Proteínas iguales
Idéntica localización



Similar función

El modelo experimental murino ha permitido el estudio de proteínas inflamatorias, apoptosis y necrosis celular

* Liao BY. Mol Biol Evol 2006; 23: 530-540

3.- Elección del citostático. Interacción sinérgica del calor con agentes antineoplásicos. Mecanismos de actuación

Mecanismos

Incremento permeabilidad de membrana
Inhibición mecanismos de reparación celular
Potenciación efecto antitumoral del citostático

In vitro

Thiotepa
Nitrosoureas
Cisplatino



Inactivación celular progresiva con incremento temperatura de 39 a 43 °C*

Doxorubicina
Bleomicina
Anfotericina B



Requieren temperatura de 42 a 43 °C**

* Hahn GM. Cancer Res 1979; 39: 2264-2268

** Storm FK. Radiol Clin North Am 1989; 27: 621-627

In vivo

Ciclofosfamida
Mecloretamina
Metilendimetano-sulfonato



Sinergia con el calor
Riesgos de aplicación

Doxorubicina
Bleomicina
Anfotericina B

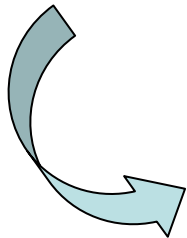


Potenciación con elevación temperatura
Mayores efectos secundarios

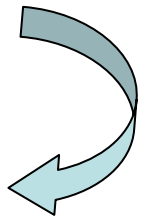
Cisplatino



Incremento de actividad con la temperatura*
Menores efectos secundarios a 41 a 43 °C



Modificación de la expresión de genes que intervienen en la apoptosis: p53, Bcl-2 y Bax**

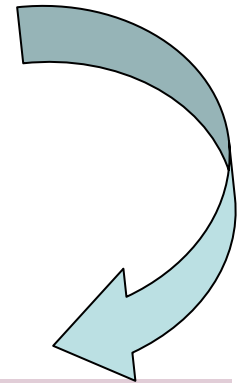


* Bergs JW. Oncol Rep 2007; 18: 219-226

** Liang H. World J Gastroenterol 2007; 13: 4365-4371

Cisplatino

Incremento progresivo de actividad con elevación de temperatura
Superiores efectos al aplicarlo a temperatura de 41 a 43 °C
Posibilidad de aplicación por vía intracavitaria*
Importante respuesta farmacocinética**
Menores efectos secundarios que por vía sistémica**



Idoneidad para la utilización del cisplatino como medicamento antitumoral en el modelo experimental murino

* Chan MY. Thorac Surg Clin 2004; 14: 549-556

** Van Ruth S. Anticancer Drugs 2003; 14: 57-65

4.- ¿Cuál es la temperatura idónea en la realización del procedimiento y cuál la concentración de cisplatino?

Hipertermia



Modificaciones citoestructurales*
Incremento de la actividad metabólica
Desestabilización de las macromoléculas
Pérdida actividad biológica: apoptosis y necrosis

Células mesoteliales

40 °C



Alteración disposición fosfolípidos de la membrana
Disminución del potencial de membrana mitocondrial

Liberación del citocromo c

Activación de Bid

Inducción de apoptosis por la vía extrínseca mediada por caspasas**

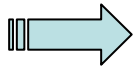


* Dewhirst MW. Int J Hyperthermia 2005; 21: 779-790

** Yu DY. Apoptosis 2007; 12: 1523-1532

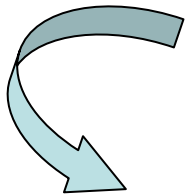
Células mesoteliales

42 °C



Pérdida del potencial de membrana mitocondrial

**Incremento concentración intracelular de Ca²⁺
Fosforilización de proteínas de choque térmico
Disminución de los niveles de HSP 70**



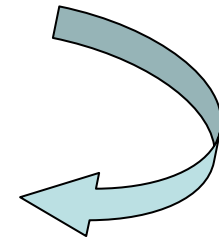
Modificación de la expresión de proteínas proinflamatorias

Significativa externalización del Fas*

Activación de las caspasas 3 y 8

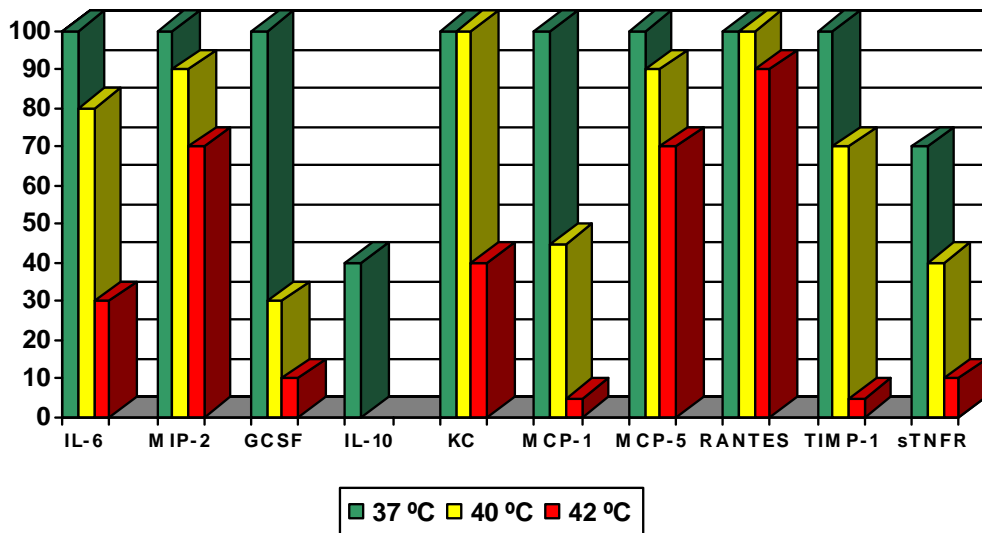
Liberación de factores desencadenantes de la apoptosis**

Activación ambas vías de la apoptosis

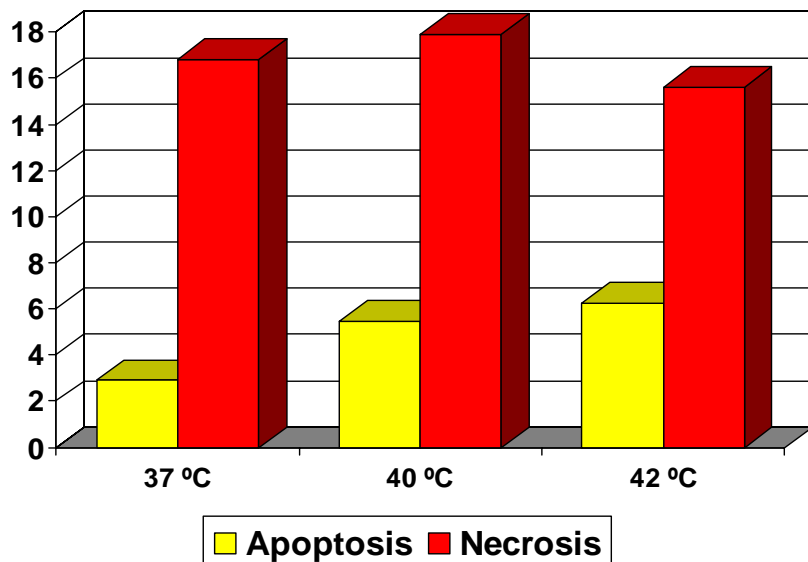


* Ahmed K. Int J Hyperthermia 2007; 23: 353-361

** Cui ZG. J Cell Physiol 2006; 206: 468-476



Citocinas	Modulación térmica		
	37 °C	40 °C	42 °C
IL-6	100	80	30
MIP-2	100	90	70
G-CSF	100	30	30
IL-10	40	--	--
KC	100	100	40
MCP-1	100	45	5
MCP-5	100	90	70
RANTES	100	100	90
TIMP-1	100	75	5
sTNF-R	70	40	10



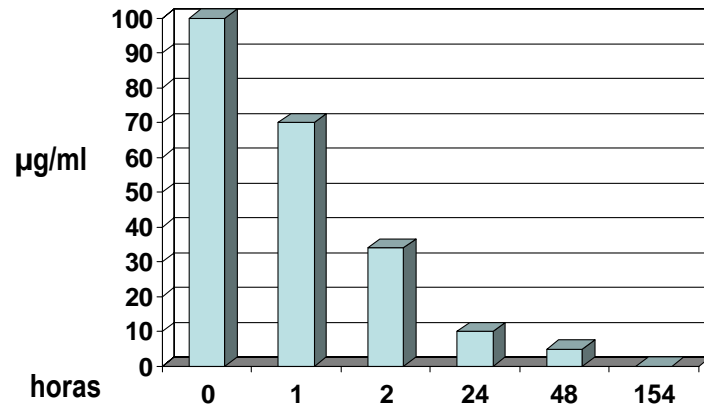
Temperatura	Apoptosis	Necrosis
37 °C	2,90	16,81
40 °C	5,46	17,90
42 °C	6,27	15,59

Concentración de cisplatino, temperatura y tiempo

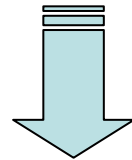
Autores	Citostático y dosis	Temperatura	Tiempo	Resultados
de Bree et al (mesotelioma)	Adriamicina 15-25 mg/m ² Cisplatino 80 mg/m ²	40 a 41 °C	90 minutos	Control enfermedad 7 meses
Van Ruth et al (mesotelioma)	Cisplatino 80 mg/m ² Doxorubicina 20 mg/m ²	40 °C	90 minutos	Supervivencia media 11 meses
Shigemura et al (derrames malignos)	Cisplatino 200 mg/m ²	42 °C	120 minutos	No influye en la supervivencia
Refaely et al (timoma con derrame maligno)	Cisplatino 100 mg/m ²	40 a 43 °C	60 minutos	Buen control de la enfermedad
Matsuzaki et al (mesotelioma)	Cisplatino 200 mg/m²	42,5 a 43 °C	120 minutos	Adecuada actividad sobre células pleurales

Concentración de cisplatino en solución de perfusión intrapleural 200 mg/m²*

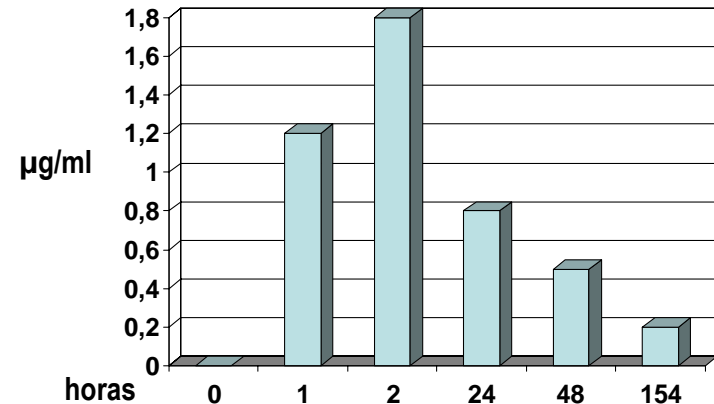
Concentración en perfusión



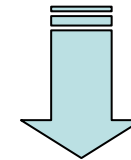
33,7 µg/ml



Concentración en suero



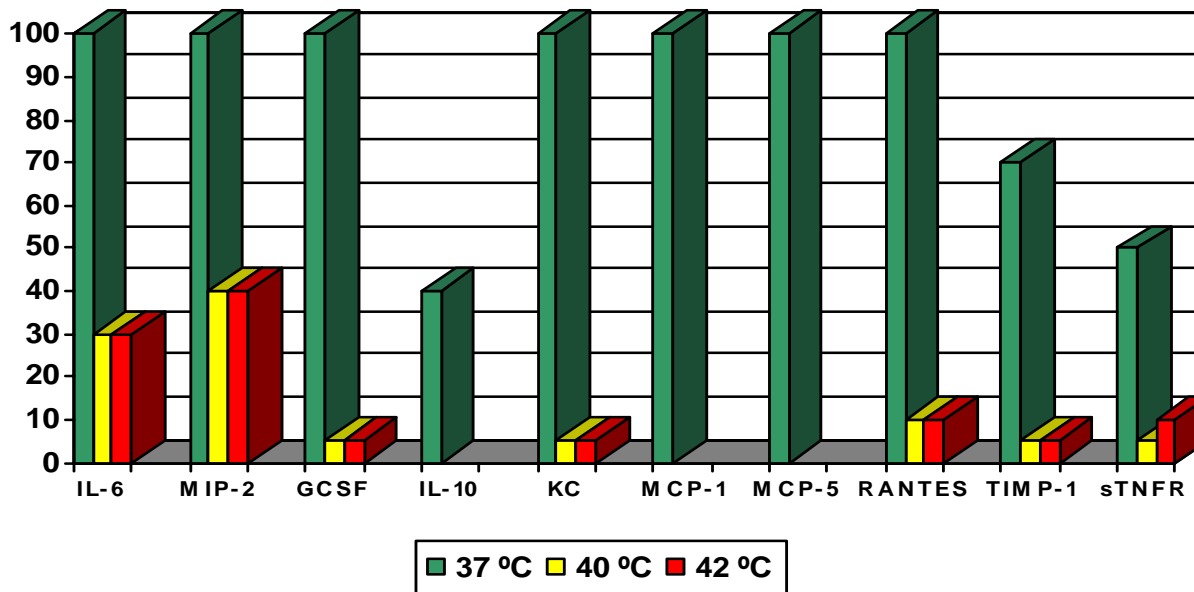
1,8 µg/ml



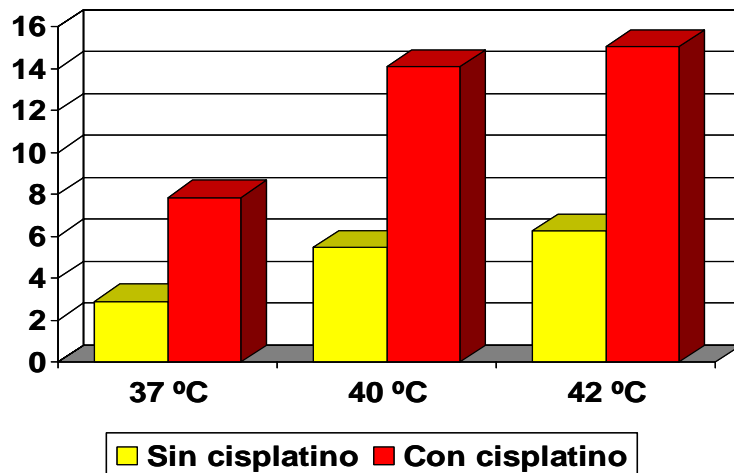
Alto nivel de cisplatino en su forma libre (33,7 µg/ml) durante la perfusión
Máximo nivel de concentración tras dos horas de perfusión (1,8 µg/ml)
Adecuada actividad sobre las células pleurales: apoptosis y necrosis

* Matsuzaki Y. Ann Thorac Surg 1995; 59: 127-131

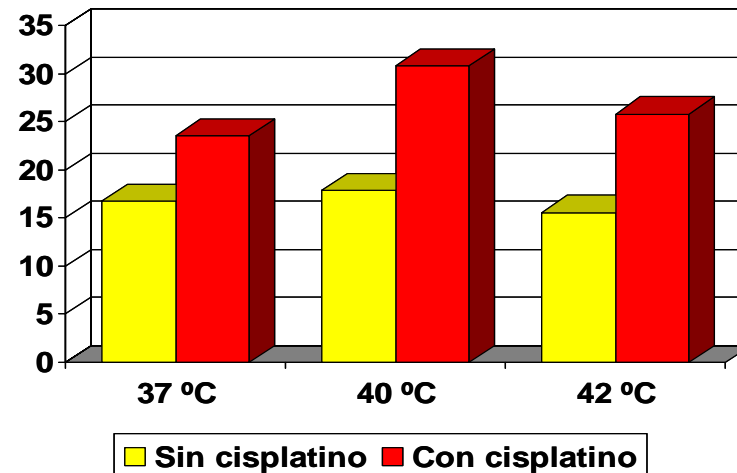
Concentración de cisplatino 33,7 $\mu\text{g/ml}$ y temperatura de 40 y 42 $^{\circ}\text{C}$



Apoptosis celular

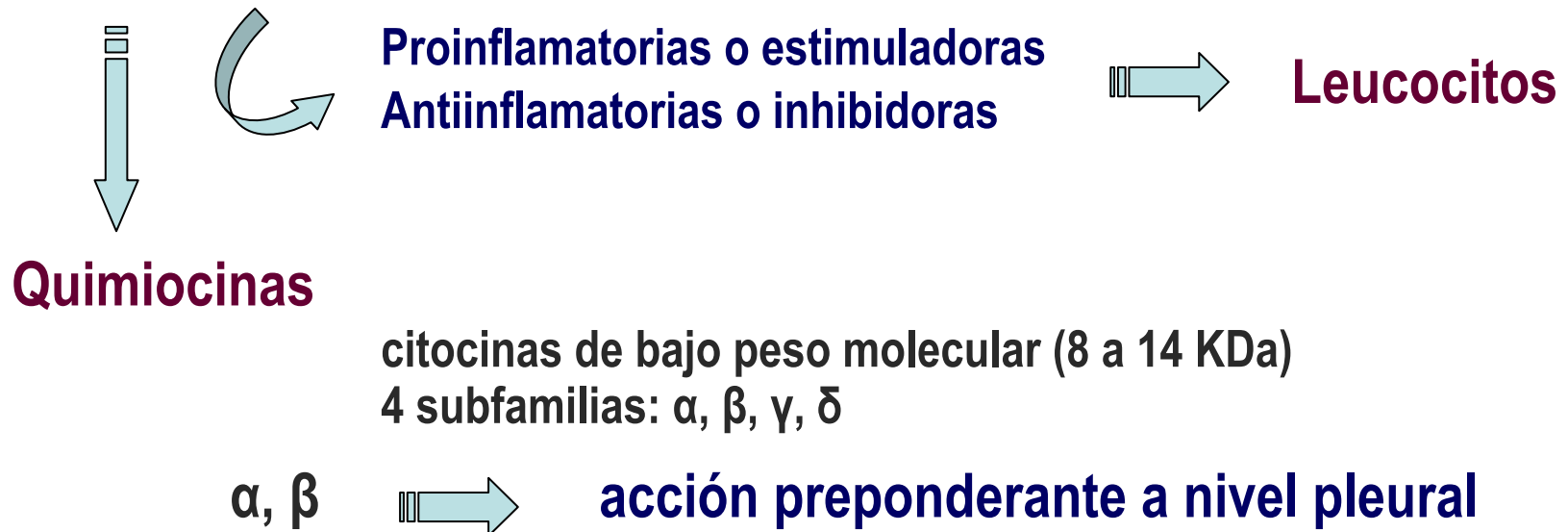


Necrosis celular



5.- ¿En qué condiciones se podría establecer la relación entre la expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis en las células mesoteliales tratadas con quimioterapia hipertérmica?

Mecanismos relacionados con muerte celular controlados por **Citocinas***



* Nicholson DW. Nature 1995; 376: 37-43

Quimiocinas α

IL-8 (KC del ratón) 

Activadora neutrófilos
Estimuladora fagocitosis

Quimiocinas β

MCP-1
MIP
RANTES 

Atrayentes monocitos y linfocitos T
Moduladoras de la apoptosis

Hipertermia y QT reducen producción de estas quimiocinas

Las variaciones en su producción pueden convertirse en **vías de señalización** de la viabilidad celular

Su detección simultánea mediante *arrays* facilita su estudio*

* Huang RP. Expert Rev Proteomics 2007; 4: 299-308

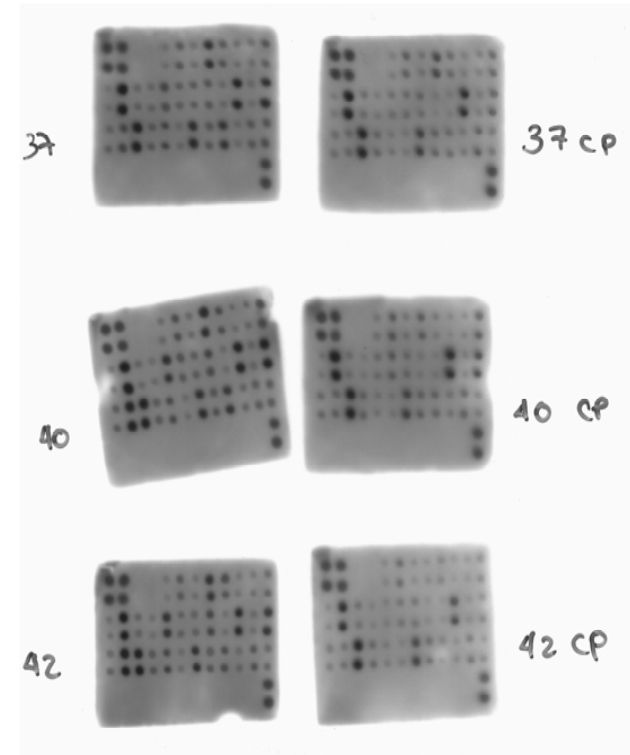
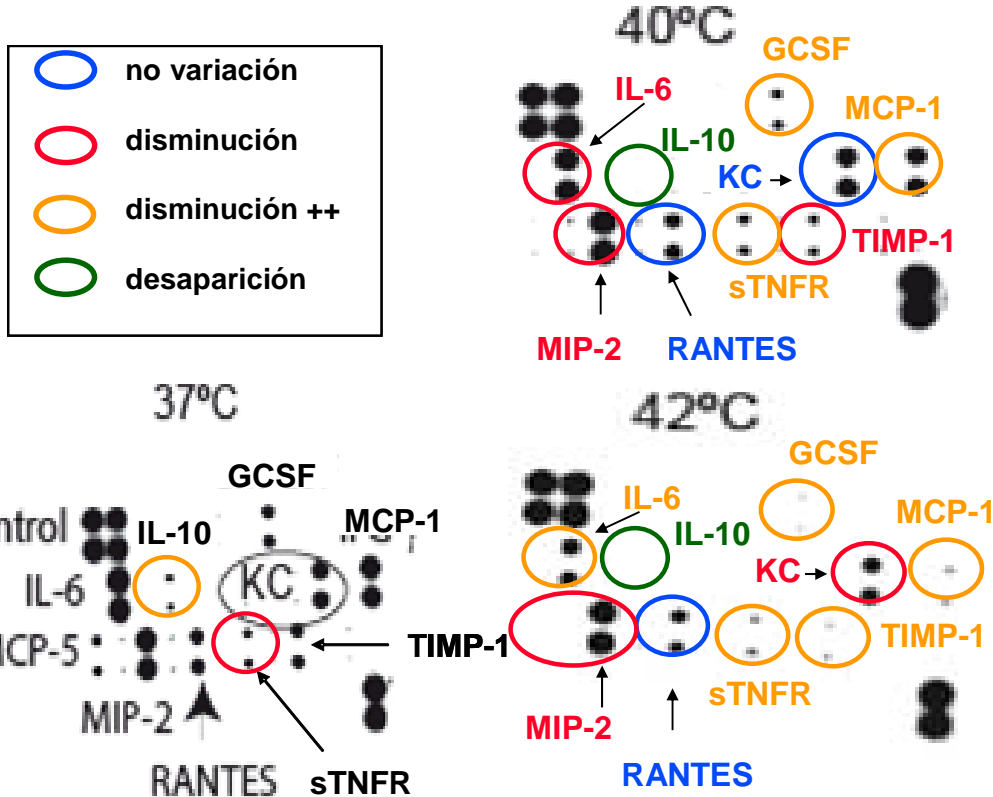
La utilización de microarrays ha permitido

Reducción de la cantidad de muestra requerida

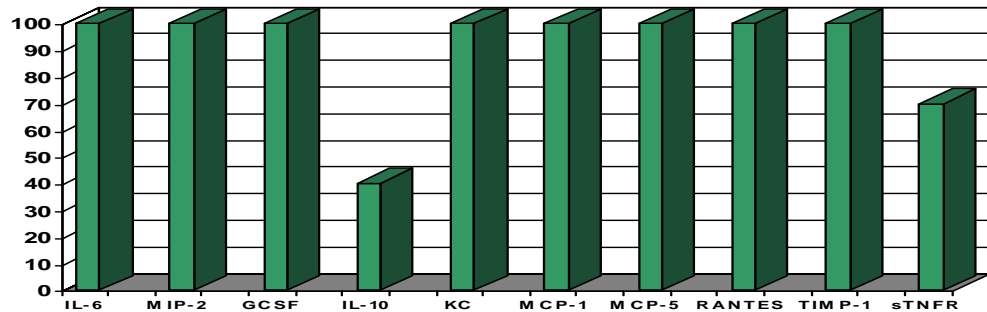
Incremento en el número de analizadores medidos

Expresión de los diferentes niveles en la misma muestra

Relación entre las distintas proteínas involucradas



6.- ¿Cómo se modifica en la célula mesotelial la expresión de citocinas con los cambios de temperatura?

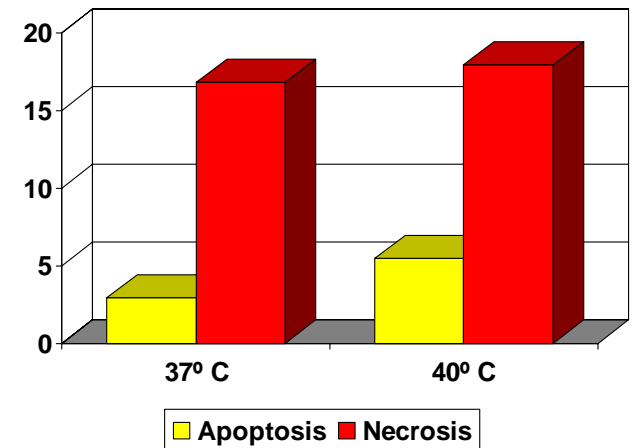
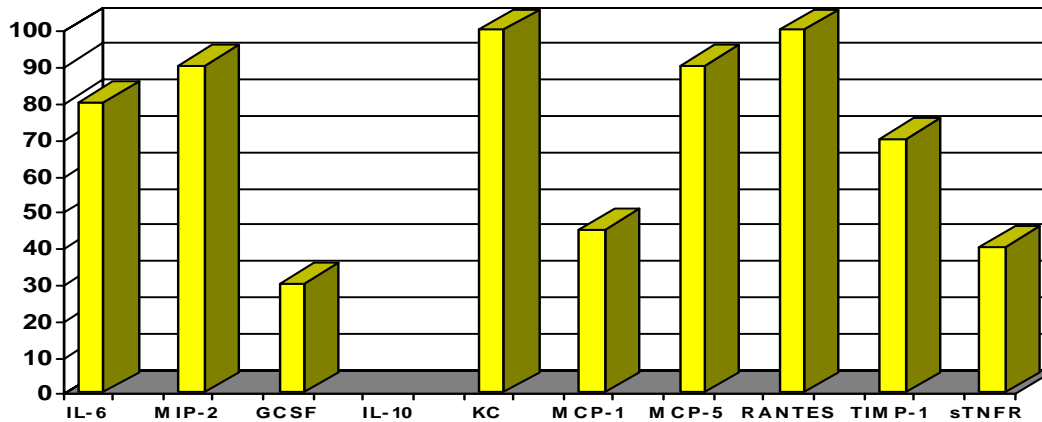


Citocinas	37 °C
IL-6	100
MIP-2	100
G-CSF	100
IL-10	40
KC	100
MCP-1	100
MCP-5	100
RANTES	100
TIMP-1	100
sTNF-R	70

Mantenimiento de citocinas proinflamatorias con alto poder atrayente de PMN y activadoras de monocitos y macrófagos: **MIP-2, KC, MCP-5 y RANTES**

Disminución de **IL-10**, inhibidora de la síntesis de otras citocinas antiinflamatorias y de **sTNF-R**, inhibidora de la actividad proinflamatoria celular

Puesta en marcha de mecanismos de regulación de la estructura y viabilidad celular frente a la hipertermia

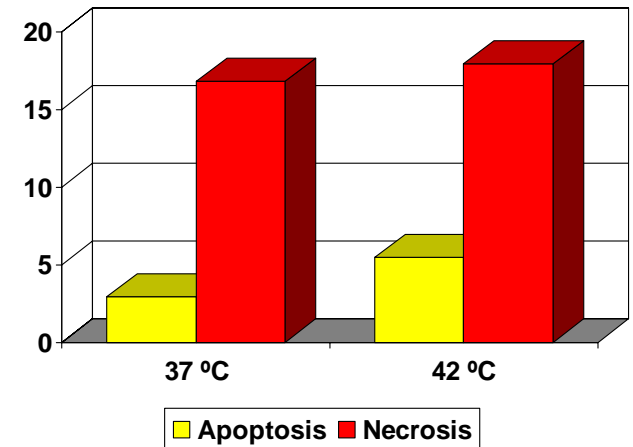
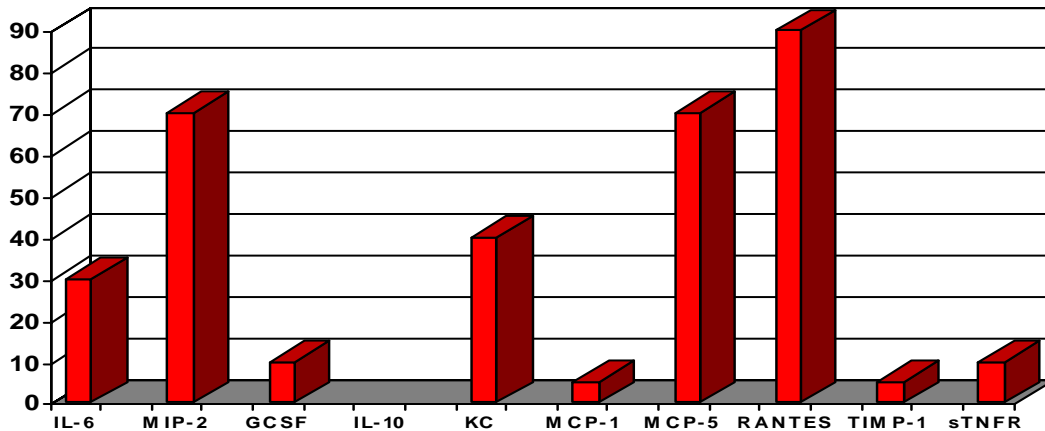


Citocinas	40 °C
IL-6	80
MIP-2	90
G-CSF	30
IL-10	--
KC	100
MCP-1	45
MCP-5	90
RANTES	100
TIMP-1	75
sTNF-R	40

Mantenimiento en altos niveles de citocinas proinflamatorias con alto poder atrayente de PMN y activadoras de monocitos y macrófagos: **IL-6, MIP-2, MCP-5, TIMP-1, KC y RANTES**

Desaparición de **IL-10**, inhibidora de la síntesis de otras citocinas antiinflamatorias y disminución marcada de **G-CSF, MCP-1 y sTNF-R**, inhibidoras de la actividad proinflamatoria celular

Pérdida de la vitalidad celular con incremento de apoptosis y necrosis



Citocinas	42 °C
IL-6	30
MIP-2	70
G-CSF	30
IL-10	--
KC	40
MCP-1	5
MCP-5	70
RANTES	90
TIMP-1	5
sTNF-R	10

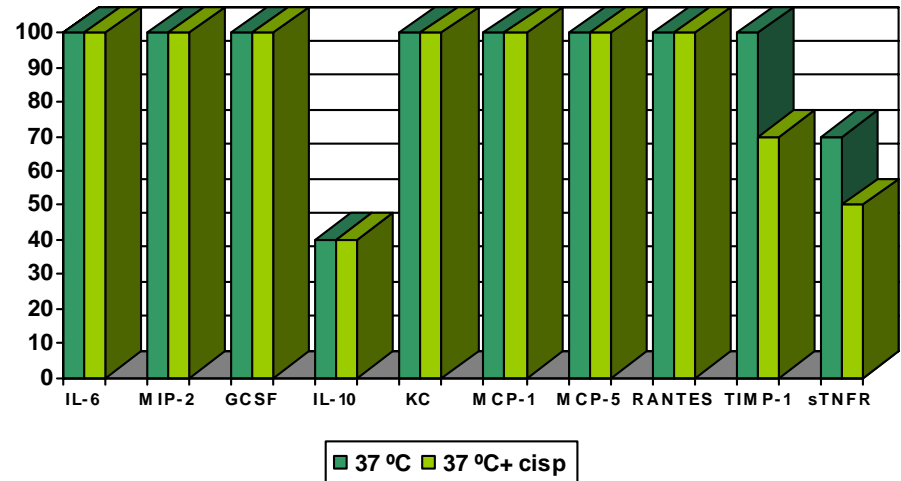
Mantenimiento en altos niveles de citocinas proinflamatorias con alto poder atrayente de PMN y activadoras de monocitos y macrófagos: **MIP-2, MCP-5 y RANTES**

Descenso importante de **IL-6, G-CSF, KC y TIMP-1** y práctica desaparición del resto de citocinas

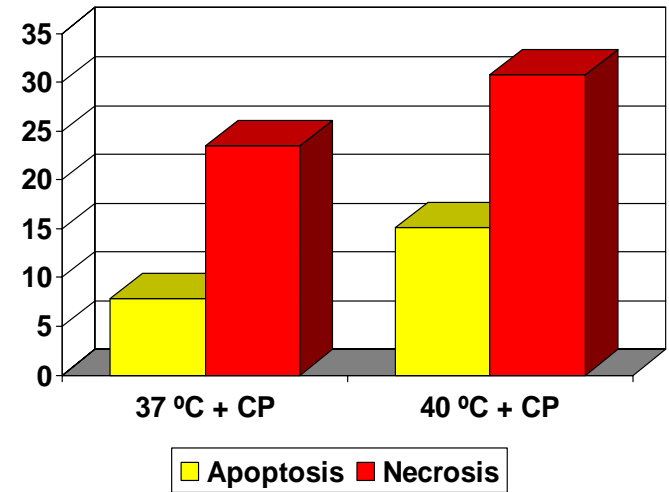
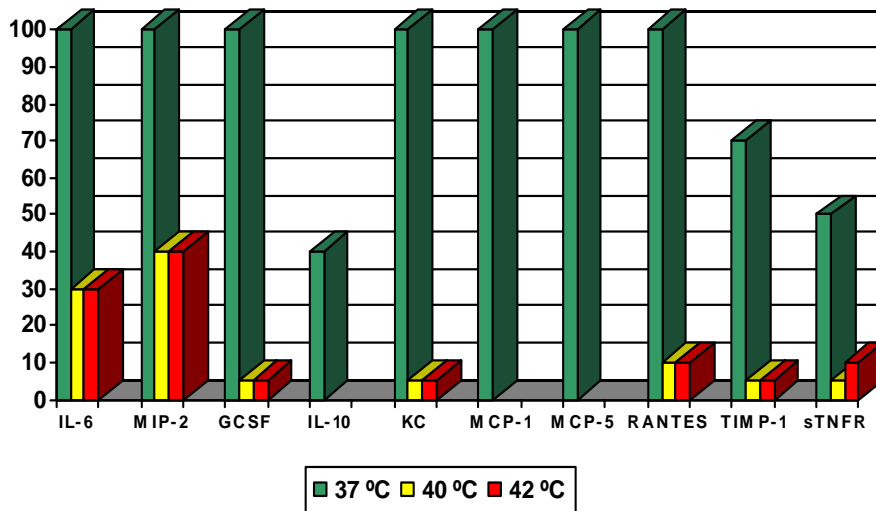
Progresiva pérdida de la vitalidad celular con incremento de apoptosis y necrosis sin cambios significativos respecto a 40 °C

7.- ¿Qué sucede con la expresión de citocinas y la inducción de apoptosis y necrosis celular mesotelial cuando a la variación de las condiciones térmicas se le suma la administración de cisplatino?

Citocinas	37 °C	37 °C+CP
IL-6	100	100
MIP-2	100	100
G-CSF	100	100
IL-10	40	40
KC	100	100
MCP-1	100	100
MCP-5	100	100
RANTES	100	100
TIMP-1	100	70
sTNF-R	70	50



A 37 °C no existen diferencias en la expresión de citocinas tras la aplicación de cisplatino



Citocinas	40 °C+CP	42 °C+CP
IL-6	30	30
MIP-2	40	40
G-CSF	5	5
IL-10	--	--
KC	5	5
MCP-1	--	--
MCP-5	--	--
RANTES	10	10
TIMP-1	5	5
sTNF-R	5	10

No existen diferencias en la expresión de citocinas a 40 °C y 42 °C (+ CP)

Discreta expresión de **IL-6**, activadora de proteínas de fase aguda, y de **MIP-2**, con capacidad quimiotáctica para los PMN

Desaparición del resto de citocinas

Incremento del porcentaje de células en apoptosis y necrosadas sin cambios significativos entre 40 °C y 42 °C (+ CP)

Conclusiones

Efectos de la Hipertermia y la Quimioterapia intrapleurales

Bases de su aplicación en el tratamiento de las neoplasias pleurales malignas

Félix Heras Gómez
Servicio de Cirugía Torácica
Hospital Clínico Universitario de Valladolid

