

**LA QUIMIOTERAPIA HIPERTÉRMICA.
EFECTOS SOBRE LAS CÉLULAS MESOTELIALES
PLEURALES Y BASES DE SU APLICACIÓN
EN EL TRATAMIENTO DEL
MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO**

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



1.- INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han mostrado que la quimioterapia hipertérmica puede ser útil en el tratamiento de procesos tumorales como el mesotelioma pleural maligno y la carcinomatosis peritoneal [1-3]. En estadios iniciales el mesotelioma afecta exclusivamente a la pleura y, tras la resección del tumor, la quimioterapia intrapleural constituiría una forma inmediata de tratamiento adyuvante. Esta terapia local podría ser también útil para frenar la enfermedad en los estadios avanzados. Con la utilización de cisplatino ^[4] se ha demostrado que la quimioterapia intrapleural resulta factible desde el punto de vista farmacocinético alcanzándose en la cavidad pleural altos niveles del fármaco con tolerable absorción sistémica ^[5].

Por otra parte, la aplicación del citostático en condiciones de hipertermia parece mejorar la acción del medicamento facilitando su absorción intrapleural y su eficacia a través de varios mecanismos como la interacción en la síntesis del ADN, la alteración de la permeabilidad en la membrana celular, la repercusión funcional sobre el citoesqueleto de la célula y la producción de apoptosis ^[6]. No obstante, en el momento actual, el empleo de la quimioterapia en condiciones de hipertermia resulta empírico al no estar aún claramente definidos sus mecanismos de acción ^[7].

Actualmente es bien conocido que todas las funciones celulares son controladas por muchos genes y vías de señalización ^[8] y que las citocinas intervienen en los mecanismos de apoptosis, angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular por lo que se han estudiado algunas proteínas proinflamatorias para determinar su influencia en la respuesta de las células mesoteliales frente a distintos agentes quimioterápicos ^[9].

Casi todas las funciones celulares son ejecutadas por proteínas, lo que hace aconsejable el estudio de sus niveles de expresión para valorar más correctamente su papel funcional ^[10]. Además, la detección simultánea de distintas citocinas facilita su estudio ya que a nivel celular las interacciones de estímulos positivos y negativos son complejas e implican frecuentemente a múltiples citocinas ^[11].

Teniendo en cuenta estos hechos podría resultar de interés establecer la relación entre el nivel de expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis celular inducidas por la hipertermia y la quimioterapia. Así, el conocimiento de la dinámica de acción de estos agentes terapéuticos sobre las células pleurales podría ser mejorado.

2.- CARACTERÍSTICAS CITO HISTOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS DE LA PLEURA

La pleura visceral está constituida por una capa monocelular de células mesoteliales que asienta sobre una membrana de tejido conjuntivo rica en proteoglicanos ^[12] bajo la que se encuentra una capa de tejido conectivo fibroelástico que contiene vasos sanguíneos y linfáticos y se continúa mediante septos con los tabiques interalveolares pulmonares. La pleura parietal presenta similares características, pero la capa profunda es más gruesa, es rica en fibras colágenas y elásticas, contiene células semejantes a fibroblastos, vasos sanguíneos, abundantes terminaciones nerviosas sensitivas procedentes de los nervios intercostales y el nervio frénico y una extensa red de vasos linfáticos con zonas lacunares que se abren directamente a la cavidad pleural. Esta capa es más laxa que en la pleura visceral y se puede fácilmente separar de la fascia endotorácica. En la pleura mediastínica destaca la presencia de agrupaciones submesoteliales de macrófagos y células linfoides que participan de forma activa en la defensa del espacio pleural ^[13].

Las células mesoteliales tienen una morfología variable, desde cúbicas o columnares con núcleos redondeados basales, hasta aplanadas con núcleos elongados. Con microscopía electrónica se aprecia que disponen de abundantes mitocondrias y de un retículo endoplásmico rugoso con numerosas vacuolas. Se encuentran unidas por desmosomas y se caracterizan por presentar múltiples microvellosidades cortas y de grosor irregular, más abundantes en las células de las zonas basales de la pleura visceral y mediastínica ^[14]. Su principal función es participar activamente en la absorción del líquido pleural y en la secreción de glicoproteínas y ácido hialurónico.

La célula mesotelial es multipotencial y capaz de responder a muy diversos estímulos. Desarrolla una importante función metabólica y participa activamente en los fenómenos de la inflamación pleural mediante la secreción de sustancias quimiotácticas, citocinas, factores de crecimiento celular, etc.

Entre estas sustancias proteicas destacan las quimiocinas de las que se han diferenciado cuatro grupos o subfamilias: α , β , γ y δ , también denominadas respectivamente: CXC, CC, C y CX3C ^[15], que actúan sobre la



membrana pleural alterando su funcionalidad e incrementando su permeabilidad. La interleucina 8 (IL-8) es un miembro de las quimiocinas CXC que se encuentra muy elevada en los derrames paraneumónicos e interviene activamente en la inflamación aguda pleural. En los derrames tuberculosos se ha comprobado la existencia de elevadas cantidades de una quimiocina CC denominada MCP-1 [16].

Durante la inflamación, ciertas citocinas inducen en las células mesoteliales la liberación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) que incrementan la permeabilidad pleural y la angiogénesis, degradan la matriz extracelular y permiten la proliferación y diseminación de las células malignas en los procesos neoplásicos pleurales.

3.- MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO

El mesotelioma pleural maligno es un tumor primitivo de las células mesoteliales que se desarrolla en la cavidad pleural y se caracteriza por ser difuso, presentar crecimiento rápido e infiltrar las estructuras adyacentes. Su desarrollo está íntimamente relacionado con la exposición prolongada y la inhalación de ciertos minerales fibrosos, principalmente el asbesto. Esta relación fue demostrada por Wagner [17] en el año 1960. El periodo de latencia desde el inicio del contacto hasta la aparición de la enfermedad es muy largo y puede llegar a ser de 30 a 50 años. Debido al amplio uso de este producto durante la segunda mitad del siglo XX se espera un incremento progresivo de su incidencia hasta el año 2020.

La alteración de las células mesoteliales y el desarrollo del mesotelioma pueden ser debidos a diversos mecanismos. Uno de ellos, es que los iones de la superficie de las fibras de amianto podrían eliminar radicales libres que modificarían el ADN celular. Otro posible mecanismo es la alteración celular debida a la eliminación de sustancias bioactivas como citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, etc., ocasionadas por el proceso inflamatorio crónico que las fibras de asbesto provocan sobre la serosa pleural. Así, un gran número de genes supresores que impedirían el crecimiento tumoral presentarían también mutaciones o serían frenados en su actividad debido al proceso inflamatorio provocado por el asbesto y a la actuación de esas sustancias bioactivas secretadas lo que impediría la función autoinmune de las células mesoteliales normales y facilitaría el crecimiento celular tumoral. Además, estas células mesoteliales malignas son capaces de producir importantes cantidades de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de los fibroblastos (FGF) que modifican la funcionalidad pleural.

El pronóstico del mesotelioma pleural maligno es infausto con una supervivencia media que oscila entre 8 y 18 meses [18]. Habitualmente y sin tratamiento, menos de un año en la mayoría de los casos [19]. Este pronóstico depende de diferentes factores entre los que destacan el tipo histológico, el estadio de la enfermedad y el estado general del paciente. La supervivencia media en estadio I es 16 meses, en el estadio II 9 meses, en el estadio III 5 meses y es mínima en el estadio IV. En diversos estudios multivariante, las variables clínicas que influyen desfavorablemente son la edad superior a los 75 años, el sexo masculino, el deterioro del estado general, el adelgazamiento, el dolor torácico, la anemia, la leucocitosis, la trombocitosis, la determinación de LDH en líquido pleural superior a 500 UI/ml y los tipos histológicos sarcomatoide y mixto [20]. Los mejores resultados se obtienen en pacientes con mesotelioma pleural epitelial en estadio Ia (localizado en pleura, sin afectación de adenopatías mediastínicas y sin extensión a distancia) a los que se les ha podido realizar una resección quirúrgica completa, que alcanzan una supervivencia media de más de 30 meses.

El tratamiento del mesotelioma pleural maligno ha sido siempre cuestionado debido a la escasa supervivencia y a los malos resultados obtenidos. Aunque no existe un tratamiento de referencia ampliamente aceptado, todos se basan en la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

En los últimos años, se ha producido un nuevo avance al añadir a la terapia trimodal la aplicación en la cavidad pleural, durante el acto operatorio y tras la cirugía de exéresis, de quimioterápicos a temperatura normal o hipertérmica. La aplicación intrapleural del quimioterápico en perfusión hipertérmica facilita la acción citostática del fármaco sobre las células mesoteliales malignas precisando menores dosis para lograr su actividad. La actuación tópica del citostático reduce los efectos colaterales adversos que presentan estos fármacos aplicados por vía sistémica. No obstante, la disparidad de criterios en el tipo de quimioterápicos utilizados, el método y la temperatura de aplicación hacen necesaria la realización de estudios más complejos que permitan clarificar el mecanismo de actuación de esta novedosa terapia.



4.- MECANISMOS DE LA MUERTE CELULAR Y SU MODULACIÓN POR AGENTES TERAPÉUTICOS

La muerte celular es un proceso que ocurre en el desarrollo de todos los seres vivos multicelulares. Clásicamente se han descrito dos mecanismos que se consideran los principales responsables de la muerte celular: la necrosis y la apoptosis ^[21].

La necrosis es la muerte celular que aparece como respuesta a un proceso que produce en la célula graves alteraciones de los mecanismos de adaptación y resistencia, con una lesión imposible de reparar. Las causas que pueden provocar la necrosis celular son múltiples: hipertermia, hipoxia, isquemia, alteraciones del pH, agentes citotóxicos, etc. Es un proceso pasivo, catabólico y degenerativo que no depende de ningún mecanismo fisiológico, que aparece sin participación de la célula y que afecta habitualmente a un amplio grupo celular provocando una alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática que permite la entrada anormal de iones, principalmente Ca^{2+} , al interior de la célula con acompañamiento pasivo de agua, lo que provoca edema celular con aumento progresivo de su tamaño y modificación de las estructuras citoplásmicas: retículo endoplásmico, mitocondrias, etc., que se hinchan y estallan. En la cromatina nuclear aparecen áreas de condensación desigual y el núcleo sufre una lenta disolución con degradación irregular del ADN. La membrana citoplasmática, distendida por el aumento de volumen celular, pierde su integridad, se rompe y permite que se liberen al exterior restos celulares, incluyendo enzimas proteolíticas, que provocan una reacción inflamatoria en el tejido adyacente con importante atracción y acúmulo de polimorfonucleares (PMN).

La apoptosis es un proceso fisiológico, controlado genéticamente, en el que la célula diseña y ejecuta el programa de su propia muerte de forma natural, como ocurre en algunas modificaciones fisiológicas o como respuesta a una serie de estímulos que pueden originarse en la propia célula o en las células adyacentes. Los mecanismos que pueden influir en su activación son diversos, unos externos debidos a los efectos de radiaciones ionizantes y agentes químicos, y otros internos, relacionados con el funcionamiento de la propia célula, como ausencia de factores de crecimiento, alteraciones bioquímicas, etc. La apoptosis es un proceso dinámico que requiere aporte de energía en forma de ATP y cuenta con la participación activa de la propia célula que es incluso capaz de sintetizar los efectores de su muerte. Se inicia por deshidratación intracelular con colapso celular, encogimiento e invaginación del citoplasma, reducción de su volumen y modificación de su forma, pasando a ser redondeada u oval, por lo que la célula se despega y separa de las células adyacentes, “aislándose” de su entorno. En la membrana citoplásmica aparecen modificaciones precoces con pérdida de su simetría, principalmente en la disposición de los fosfolípidos, con alteraciones que provocan que los residuos de fosfatidilserina, que habitualmente se encuentran en la cara interna membranosa, se sitúen también en la cara externa y faciliten que estas células apoptóticas sean detectadas por los macrófagos.

Existen dos vías de inducción de la apoptosis, una extrínseca o de los receptores de muerte, en la que las señales de destrucción proceden del exterior de la célula y son captadas por diversos receptores que pertenecen a la familia de genes del receptor TNF (Tumor Necrosis Factor), y otra intrínseca o mitocondrial en la que es la propia célula la que inicia su proceso de destrucción ante la aparición de estímulos internos (regulada por una familia de proteínas denominadas Bcl-2 que controlan la actuación de un grupo de cistein-proteasas denominadas caspasas).

5.- HIPERTERMIA EN ONCOLOGÍA

En oncología, la hipertermia es utilizada en el tratamiento de procesos neoplásicos ya que el calor influye en la proliferación celular, principalmente en las fases M y S del ciclo mitótico ^[22] con incremento de la actividad metabólica y desestabilización de las macromoléculas intracelulares (lípidos, carbohidratos, aminoácidos, etc.). Las primeras manifestaciones detectables son aumento del volumen y del espesor de las membranas celulares, alteración en la actividad mitocondrial e inhibición de la síntesis de proteínas, ADN y ARN ^[6]. En fases más avanzadas se suma la contracción del citoplasma con destrucción de los microtúbulos que conforman el citoesqueleto. Por último, se produce la fragmentación de la membrana y la eliminación al espacio intercelular de los restos celulares.

Tanto en experiencias in vitro como en experimentación animal se ha comprobado que las células más sensibles a la acción del calor son las neoplásicas, las que se encuentran en situaciones de hipoxia, las que presentan



un pH ácido y las que se encuentran en fase de mitosis ^[22]. El calor induce alteraciones en el entorno del tumor que provocan que las células neoplásicas se sensibilicen al efecto de la radiación y de ciertas drogas citotóxicas, principalmente cuando estas terapias se aplican a temperaturas de 39 a 43 °C ^[23]. A pesar de estos datos, los mecanismos íntimos de la destrucción celular inducida por la hipertermia no han sido aún claramente establecidos. La determinación de la expresión de proteínas de choque térmico y la inducción y la regulación de la apoptosis celular han demostrado ser de suma utilidad para cuantificar los efectos celulares debidos a la hipertermia ^[24].

De forma experimental se ha comprobado que en cultivos de células neoplásicas humanas los efectos del cisplatino son muy superiores cuando se aplican a temperaturas de 41 a 43 °C ^[25]. Además, en estudios sobre ratones a los que se habían trasplantado células neoplásicas humanas, se ha demostrado que la hipertermia mejora los resultados de la QT, provocando alteraciones de las membranas del citoplasma y del núcleo y modificación en la expresión de ciertos genes que intervienen en la apoptosis ^[26]. La base farmacológica que justifica esta respuesta celular podría concretarse según Sugarbaker et al., en que el calor permite que el citostático penetre más fácilmente en el interior de las células ^[27].

Diversos estudios de los últimos años han propuesto la utilización de quimioterápicos por vía intracavitaria (intrapleural e intraperitoneal) ^[4], principalmente adriamicina y cisplatino, para el tratamiento de determinados procesos neoplásicos con predominante desarrollo loco-regional como el mesotelioma pleural maligno y la carcinomatosis peritoneal.

6.- MUERTE CELULAR INDUCIDA POR AGENTES TERAPÉUTICOS: HIPERTERMIA Y QUIMIOTERAPIA

Recientes estudios ^[28,29] han demostrado que la hipertermia, aislada o en combinación con otros factores, principalmente la adición de citostáticos, es capaz de inducir la muerte celular por diversos mecanismos, aunque todos convergen en la fragmentación del ADN y la destrucción de la célula, bien por apoptosis o por necrosis. El aumento de temperatura produce en la célula la pérdida de la simetría de los lípidos de la membrana y cambios en la disposición de la fosfatidilserina que pasa a situarse en la cara externa de la membrana citoplásmica. Temperatura de 40 °C provoca disminución del potencial de membrana mitocondrial con liberación del **citocromo c** (componente de la cadena transportadora de electrones necesaria para la respiración mitocondrial), al citoplasma ^[28].

El aumento de temperatura a 42 °C produce pérdida del potencial de membrana de la mitocondria y activación de las caspasas 3 y 8 ^[29]. La temperatura elevada también produce un incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺ que se acompaña de la fosforilación de proteínas de choque térmico que actúan disminuyendo el potencial de membrana de la mitocondria y permiten la liberación de factores desencadenantes de la apoptosis ^[30].

Estudios experimentales han demostrado que la RT y la QT aplicadas a células tumorales en condiciones de hipertermia provocan cambios en la expresión de los genes reguladores de la apoptosis que influyen significativamente en la muerte celular ^[26].

7.- MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN BIOMOLECULAR DEL DAÑO CELULAR

Todos los mecanismos relacionados con la muerte celular están controlados por una serie de sustancias que influyen de forma significativa en su activación, regulación y ejecución. Han recibido diversos nombres, aunque actualmente se denominan globalmente con el término **citocinas**, que agrupa una gran variedad de mediadores celulares: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral, etc.,

Las **citocinas** son sustancias polipeptídicas de bajo peso molecular constituidas por 120 a 180 aminoácidos, sintetizadas y liberadas por múltiples células como respuesta a diferentes estímulos. Su secreción está intensamente regulada y su producción es muy limitada, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan en cantidades suficientes para realizar sus acciones biológicas. Dependiendo de la célula que las sintetiza, han recibido diversos nombres; monocinas a las procedentes de los monocitos y los macrófagos, linfocinas a las producidas por los linfocitos, interleucinas a las sintetizadas por los leucocitos polimorfonucleares, etc. También



son producidas por células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos, células endoteliales, etc. Su función principal es participar como mediadores intercelulares para inducir y regular múltiples respuestas biológicas.

Entre las citocinas, destacan las **quimiocinas** que son un grupo numeroso de polipéptidos con función quimiotáctica, que actúan como promotoras e iniciadoras de la respuesta inflamatoria [31]. Están secretadas por diversas células en respuesta a estímulos endógenos y exógenos, e intervienen en la activación de los leucocitos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, etc.) y su migración a los focos inflamatorios. Su acción se realiza interactuando con los receptores específicos de membrana de las células sobre las que ejercen su actividad. La relación de las quimiocinas con sus receptores se caracteriza porque la mayoría de los receptores interactúan con múltiples ligandos y la mayor parte de los ligandos interactúan con más de un receptor.

8.- CITOCINAS E INFLAMACIÓN

La respuesta inflamatoria se produce ante la presencia de un estímulo que modifica el entorno celular o la propia célula y que activa la secreción de diversos mediadores inflamatorios. Entre los estímulos desencadenantes destacan factores físico-químicos como hipertermia, radiaciones ionizantes, quimioterápicos, etc. Una de las funciones más importantes de las citocinas es que participan de forma activa en la respuesta inflamatoria manteniendo un control y equilibrio de la misma, mediados por su actuación sobre diversos genes y factores de transcripción que activan o bloquean los receptores de membrana de las células sobre las que actúan.

Estas citocinas poseen un efecto antagónico, unas presentan actividad proinflamatoria y otras realizan una actividad supresora de la inflamación y se denominan antiinflamatorias o inmunosupresoras.

Entre las **citocinas proinflamatorias** destacan el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), las interleucinas 1 beta, 2, 6 y 8 ($\text{IL-1}\beta$, IL-2 , IL-6 , IL-8) y el interferon gamma ($\text{INF-}\gamma$) [32,33], que tienen diversos efectos biológicos, entre ellos la activación de los macrófagos, y la producción de síntesis de óxido nítrico, activación del factor nuclear kappa beta ($\text{FNK}\beta$), expresión del factor tisular (FT), modulación del gen de expresión de trombosmodulina, activación de fibrinólisis, expresión de moléculas de adhesión endotelial, activación de polimorfonucleares, síntesis de proteínas de fase aguda, así como la maduración y diferenciación de los linfocitos B y T y de los megacariocitos [34]. Este proceso condiciona el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) [35] cuyo objetivo es aumentar la permeabilidad vascular y facilitar la llegada de polimorfonucleares y otras células inflamatorias al foco de lesión para que realicen su función defensora. Además de los efectos locales, las citocinas pueden actuar de forma endocrina con efectos sistémicos que estimulan las defensas del organismo. La secreción de IL-6 (considerada como el “pirógeno endógeno”), induce la elevación de la temperatura corporal y la aparición de fiebre, y la activación de la síntesis de proteínas de fase aguda inflamatoria (proteína C reactiva). La respuesta proinflamatoria es contrarrestada por la liberación de **citocinas antiinflamatorias** o inmunosupresoras que inhiben el crecimiento celular y suprimen la secreción de otras citocinas. Entre ellas destacan las interleucinas 4, 10 y 12 (IL-4 , IL-10 , IL-12) [36,37] y los antagonistas de receptores de citocinas, que inhiben la expresión de moléculas de adhesión, del factor tisular (FT) y de los efectos vasculares mediados por el óxido nítrico, leucotrienos y radicales libres de oxígeno, además de modular la función de los linfocitos T, macrófagos y la síntesis de inmunoglobulinas y citocinas, lo que constituye el síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora (SRAC) [38]. La IL-10 es una proteína antiinflamatoria que suprime la activación de los macrófagos y la producción de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-8 [39]. El factor de crecimiento transformador beta ($\text{TGF-}\beta$) tiene también una poderosa actividad antiinflamatoria [37].

9.- CITOCINAS RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN

Hay una serie de citocinas que están directamente relacionadas con los fenómenos inflamatorios y cuya determinación permite valorar la respuesta celular a los diferentes estímulos. Entre ellas destacan:

- 1) **RANTES** (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted). Quimiocina también denominada CCL5 que forma parte de la familia de IL-8 . Es quimioatrayente selectiva de los linfocitos T y los monocitos, aunque también actúa sobre los eosinófilos y los basófilos. Interviene de forma activa en el reclutamiento de los leucocitos en los focos inflamatorios. Induce la proliferación y activación de células NK (Natural Killer) y CHAK (CC-Chemokine-Activated

- Killer)^[40].
- 2) **MCP-1** (Monocyte Chemotactic Protein-1). También llamada SCYA2 (Small inducible CYtokine A2), MCAF (Monocyte Chemotactic and Activating Factor) y CCL2. Es un polipéptido que forma parte de la familia SIG (Small Inducible Gene) y desempeña un importante papel en el reclutamiento de monocitos en los focos inflamatorios^[41].
 - 3) **MCP-5** (Murine macrophage/monocyte Chemotactic Protein-5). También denominada CCL12 y SCYA12 (Small inducible CYtokine A12). Es un péptido de la familia de quimiocinas β o CC. Es un potente quimioatrayente de los monocitos humanos^[42] y de los macrófagos peritoneales del ratón. Muestra una débil respuesta sobre los eosinófilos y no es activo sobre los neutrófilos del ratón. Participa en los fenómenos inflamatorios alérgicos.
 - 4) **TIMP-1** (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-1). También denominada EPA (Erythroid Potentiating Activity). Es una peptidasa de la familia de las metaloproteinasas que interviene en la degradación de la matriz extracelular. Incrementa la actividad catabólica de la dermis y es responsable de la degradación del colágeno y de las fibras elásticas de la piel^[43]. Posee actividad antiapoptótica y es capaz de promover la proliferación de gran variedad de células como respuesta a la actuación de múltiples citocinas y hormonas.
 - 5) **MIP-1** (Macrophage Inflammatory Proteins-1). En los humanos existen dos formas principales^[44] MIP-1 α y MIP-1 β , también llamadas respectivamente CCL3 y CCL4. Son producidas por los macrófagos y activan los neutrófilos, basófilos y eosinófilos que participan en la inflamación aguda. También inducen la síntesis y liberación de otras citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , de los fibroblastos y de los macrófagos.
 - 6) **MIP-2** (Macrophage Inflammatory Proteins-2). También llamada CXCL2 y Gro- β (Growth-regulated protein β). Está secretada en los focos inflamatorios por los monocitos y los macrófagos y es quimiotáctica para los leucocitos polimorfonucleares y las células hematopoyéticas^[45].
 - 7) **G-CSF** (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) o factor de estimulación de colonias de granulocitos. Es una glicoproteína que interviene en la producción y regulación de los neutrófilos participando en la activación de sus células precursoras y en la aceleración de su maduración. No actúa sobre los macrófagos ni sobre los eosinófilos. Está producida por los fibroblastos, las células endoteliales y los monocitos en respuesta a procesos infecciosos e inflamatorios y actúa sobre los precursores hematopoyéticos de los granulocitos y sobre los granulocitos maduros. También realiza otras funciones como estimulación de la fagocitosis y de la citotoxicidad mediada por anticuerpos.
 - 8) **IL-6** (Interleucina 6). Es una citocina considerada clásicamente como proinflamatoria que presenta una amplia variedad de funciones biológicas. Está producida principalmente por los linfocitos T y B, los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales en respuesta a estímulos que puedan provocar lesión tisular e inflamación. Actualmente se considera que tiene propiedades pro y antiinflamatorias. Es uno de los mediadores más importantes en la activación de la fiebre y en la producción de proteínas de fase aguda, pero inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, INF γ y MIP-2.
 - 9) **IL-10** (Interleucina 10). También denominada CSIF (Cytokine Synthesis Inhibitory Factor). Es una citocina antiinflamatoria producida principalmente por los monocitos y los linfocitos T y B, regulando al mismo tiempo su función e induciendo la síntesis de inmunoglobulinas G (Ig G). Presenta también actividad inmunorreguladora y se la considera la citocina inmunosupresora por excelencia que actúa inhibiendo la síntesis de otras citocinas proinflamatorias como: IL-2, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α , RANTES, MIP-1, MIP-2 y GM-CSF. Tiene efectos antiproliferativos sobre diversos tipos de células y es copartícipe en el crecimiento in vitro de mastocitos. En ratones se ha comprobado que la IL-10 producida por los mastocitos contrarresta los efectos inflamatorios de estas mismas células en los procesos alérgicos^[46].
 - 10) **IL-8** (Interleucina 8). También denominada CXCL8, es una citocina íntimamente relacionada con los fenómenos inflamatorios actuando como una de las mayores mediadoras de la respuesta



a la inflamación. Es sintetizada por todos los leucocitos y por otras muchas células: fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, etc., como respuesta a gran cantidad de estímulos. Su función principal es la quimioatracción, activación y degranulación de los neutrófilos en el foco inflamatorio, aunque también es capaz de atraer basófilos y eosinófilos y estimular la fagocitosis por parte de los macrófagos. Posee también una importante actividad angiogénica.

- 11) **KC** (Keratinocyte-derived Chemokine) es una quimiocina descrita en el ratón que presenta la misma actividad que la IL-8 y actúa como un potente quimioatrayente de neutrófilos cuando existe un estímulo inflamatorio [47]
- 12) **sTNF-R** (soluble Tumor Necrosis Factor-Receptor). Los receptores solubles del factor de necrosis tumoral son complejos proteicos que se producen por degradación proteolítica de la porción extracelular de los receptores de membrana para el TNF (mTNF-R) en respuesta a los mismos estímulos que activan la secreción de TNF. Los sTNF-R compiten con los mTNF-R para unirse a TNF por lo que la presencia en el espacio extracelular de cantidades elevadas de sTNF-R bloquea a esta citocina e inhibe su actividad proinflamatoria sobre la célula [48]. La presencia de sTNF-R está estimulada por la acción de IFN α , β y γ y disminuida por la IL-1.

10.- OBJETIVOS

Este estudio, realizado en un modelo experimental murino, centra su investigación en las células obtenidas de la cavidad pleural, con los siguientes objetivos:

- 1) Determinar en las células pleurales la respuesta proinflamatoria inducida por la hipertermia mediante el análisis del nivel de expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y su relación con la producción de apoptosis y necrosis celular.
- 2) Precisar la modificación de esta respuesta tras la administración de cisplatino en diferentes condiciones de temperatura.

11.- MATERIAL Y MÉTODOS

11.1.- Animales de experimentación

Se han utilizado ratones albinos machos de 6 semanas de edad y peso de 40 a 50 gramos, de raza Swiss OF1 (Oncis, France, cepa1) sin características específicas ni pedigrí, procedentes de la introducción de la CF1 (Carworth farms cepa1) en Charles River Laboratories, France, en 1996. Estos ratones son eutímicos e inmunocompetentes. Su temperatura corporal es de 37,4 °C. El número total de animales utilizados ha sido de 90 ratones, divididos en 6 grupos de 15. Se han manejado bajo estricto cumplimiento de la normativa sobre protección de los animales utilizados para la experimentación (Real Decreto 1201/2005, 10 de octubre de 2005, sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos).

11.2.- Procedimiento anestésico y quirúrgico para la obtención de las células pleurales

Administración por vía intramuscular de pentobarbital sódico a dosis de 0,5 mg/100 g de peso para la obtención de la hipnosis total del animal. Administración complementaria de relajante muscular: bromuro de pancuronio a dosis de 0,1 mg/ 100 g de peso. Obtención por la vía farmacológica señalada de parada cardiorrespiratoria.

Abordaje quirúrgico inmediato de la cavidad pleural derecha. Incisión cutánea de esternolaparotomía media. Apertura de la línea media abdominal y del peritoneo parietal. Visualización y comprobación de la integridad de ambos hemidiafragmas. Apertura a través de incisión longitudinal paraesternal con inicio en el seno cardiofrénico homolateral, de la cavidad pleural derecha. Comprobación desde la cavidad pleural de la integridad del hemidiafragma derecho y de la ausencia de restos hemáticos o hallazgos macroscópicos patológicos pleuropulmonares.

Instilación en la cavidad pleural, mediante bombeo a presión, de suero fisiológico tamponado con fosfato, PBS 0,15 M (ClNa 8 g/l; ClK 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 7H₂O 1,44 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l). Mantenimiento del tampón fosfato salino durante dos minutos en la cavidad pleural. Aplicación de maniobras mecánicas de agitación del líquido pleural para facilitar la descamación en el mismo de las células mesoteliales pleurales. Aspiración de la totalidad del líquido acumulado en la cavidad pleural y recogida de éste en medio de transporte estéril en condiciones térmicas de 4 °C.

11.3.- Manejo de células mesoteliales y macrófagos pleurales en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular

Las células pleurales fueron resuspendidas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium sin L-glutamina y rojo de fenol Bio-Whittaker, Walkersville, MD, EEUU), suplementada con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 50 µg/ml de gentamicina y 2 mM de glutamina en la ausencia de suero. Las células no adheridas fueron retiradas 2 horas después de la adherencia a 37 °C, por lavado efectuado tres veces con líquido de medio de cultivo fresco. La adherencia de las células fue comprobada por su capacidad de adhesión a partículas de zymosan y por tinción con esterasa no específica. Obtención en cada experiencia de un número de células pleurales que oscilaron de 16 a 20 x 10⁶ células, suficientes para garantizar en cada experiencia la fiabilidad de los resultados de las distintas determinaciones.

11.4.- Establecimiento de grupos experimentales de estudio

- 1) Basal: cultivo de células mesoteliales en condiciones normotérmicas (37 °C) sin modificación farmacológica.
- 2) Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 40 °C durante 120 minutos.
- 3) Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 42 °C durante 120 minutos.
- 4) Cultivo de células mesoteliales en condiciones normotérmicas (37 °C), sometidas a tratamiento citostático con cisplatino* durante 120 minutos.
- 5) Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 40 °C y tratamiento citostático con cisplatino* durante 120 minutos.
- 6) Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 42 °C y tratamiento citostático con cisplatino* durante 120 minutos.

* Dosis de cisplatino administrada: 33,7 µg/ml.

11.5.- Determinaciones en cada uno de los grupos de estudio establecidos

- 1) Citocinas proinflamatorias en el sobrenadante del cultivo celular usando RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc.
- 2) Determinación de la apoptosis celular versus necrosis, mediante detección en la superficie celular de fosfatidilserina con la Anexina V-FITC con el kit de detección de apoptosis de Pharmingen para detectar apoptosis, y con tinción vital de Ioduro de Propidio para determinar la existencia de necrosis.

Las muestras fueron analizadas usando FACScan y el programa Cellquest (Becton Dickinson).

11.6.- Estudio de liberación de proteínas proinflamatorias

Utilización del kit RayBiotech especialmente diseñado para medios de cultivo. Formato de array simple, de alta sensibilidad, para la determinación simultánea de la expresión de los niveles de múltiples citocinas en el medio de cultivo. Estos arrays contienen, entre otras, las proteínas que inicialmente presentan más relevancia fisiopatológica.

El sobrenadante del cultivo fue incubado con RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc. y realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para lo que se incubó el sobrenadante obtenido del cultivo de las células con el array que contiene los distintos anticuerpos. Posteriormente se añadió el cocktail que contiene los anticuerpos biotinilados y tras una incubación de dos horas se procedió a la adición de HRP conjugada a estreptavidina.

Tras la incubación con HRP conjugada con estreptavidina, la detección de la reacción se realizó con el sistema Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) utilizando películas autorradiográficas que posteriormente fueron escaneadas por transparencia utilizando un densitómetro de laboratorios BioRad (Hercules, CA) y el software denominado Quantity One® del mismo fabricante. Los blots se cuantificaron tras ser normalizados con los controles positivos incorporados en las membranas. Sólo las variaciones sobre el control que mostraron un incremento del doble de concentración sobre la densidad basal fueron consideradas positivas.

11.7.- Estudio de la apoptosis y la necrosis celular

Protocolo de determinación de la apoptosis y la necrosis celular, mediante tinción con Anexina V-FITC e Ioduro de Propidio con las siguientes soluciones empleadas: 10x Binding Buffer (0,1M HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 25 mM CaCl₂). Diluido a 1x previo al uso. Ioduro de Propidio. Solución de 50 µg de Ioduro de

Propidio en 1x PBS buffer. Recomendado para uso en paralelo con Anexina V-FITC o Anexina V-Biotin. 1x PBS Buffer: 0,15 M (ClNa 8 g/l; ClK 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 7H₂O 1,44 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l). pH ajustado a 7,2. Autoclave.

Las células recolectadas se lavaron dos veces en PBS a 4 °C y se resuspendieron a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml en buffer de unión en 500 µl RPMI utilizando tubos de hemólisis. Aplicación de estímulos térmico y químico fijados para el grupo experimental correspondiente. Agitación en baño a 37 °C durante el tiempo necesario.

Para detener la incubación, las células se transfirieron a tubos de microcentrífuga Eppendorf y se centrifugaron a 5000 x g durante 30 segundos a 4 °C. Lavado con PBS frío a 4 °C y centrifugación a 5000 x g durante 30 segundos a 4 °C. Resuspensión de las células en 100 µl de buffer de unión frío. Adición de 2 µl de Ioduro de Propidio (1 mg/ml) y 2 µl de Anexina. Mezclado suave e incubación durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Adición de 400 µl de buffer de unión a cada tubo y análisis inmediato por citometría de flujo. Análisis de las muestras usando el FACScan y el programa Cellquest (Becton Dickinson).

Se determinaron como células en apoptosis las que presentaban tinción con Anexina positiva (+) y tinción con Ioduro de Propidio negativa (-). Se consideraron células necrosadas las que presentaban tinción con Anexina positiva o negativa (+/-) y tinción con Ioduro de Propidio positiva (+).

La expresión porcentual de la producción de apoptosis y necrosis celular fue constatada en cada uno de los grupos experimentales. Complementariamente, fue también determinada la dinámica de expresión de la producción de apoptosis y necrosis tras someter la muestra a temperaturas de 37, 40 y 42 °C, y la derivada de la adición de cisplatino a las muestras en las condiciones térmicas señaladas (relación entre intensidad de fluorescencia (log 10) y número de eventos).

1.8- Tratamiento estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 12.0. Teniendo en cuenta el objetivo o propósito de la prueba para la variable o variables seleccionadas, la selección de la muestra en forma probabilística y las limitaciones que se pudieran tener en cuanto a los supuestos que se deben cumplir en las pruebas paramétricas, fueron utilizadas las pruebas estadísticas no paramétricas. Para el análisis de medias de dos muestras aleatorias independientes, el test de la U de Mann-Whitney como alternativa a la prueba paramétrica de la t de Student. Para comparar más de 2 muestras independientes, la prueba H de suma de rangos o prueba de Kruskal-Wallis, fue utilizada en sustitución del análisis de varianza de un sentido de la estadística paramétrica. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

12.- RESULTADOS

12.1.- Determinación de la producción de proteínas proinflamatorias

El análisis del sobrenadante del cultivo celular a 37 °C objetivó la expresión (positividad del blot respecto al control, medida en porcentaje (%)) de las siguientes citocinas: 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%) y sTNF-R (70%).

La elevación de la temperatura a 40 °C durante dos horas no indujo cambios en la expresión de KC y RANTES, disminuyó discretamente la expresión de IL-6 (80%), MIP-2 (90%), MCP-5 (90%), TIMP-1 (75%); intensamente la de G-CSF (30%), MCP-1 (45%) y sTNF-R (40%) y provocó la desaparición de la expresión de IL-10.

Cuando la temperatura del sobrenadante del cultivo celular fue elevada a 42 °C se detectó un descenso de la expresión de todas las citocinas; mínimo de RANTES (90%), moderado de MIP-2 (70%) y MCP-5 (70%) e intenso de IL-6 (30%), G-CSF (30%), KC (40%) y sTNF-R (10%), con la práctica desaparición de MCP-1 (5%) y TIMP-1 (5%) y la total desaparición de IL-10.

En la gráfica 1 se muestran las determinaciones registradas en los porcentajes de expresión de las citocinas en las diferentes condiciones de temperatura a 37, 40 y 42 °C, a las que fueron sometidos los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Tras la adición al sobrenadante celular de cisplatino a dosis de 33,7 µg/ml, en las diferentes condiciones de temperatura de 37, 40 y 42 °C, se apreciaron las siguientes respuestas:

- 1) A temperatura de 37 °C sólo se detectó descenso de la expresión de IL-10 (40%), TIMP-1 (70%) y sTNF-R (50%). No se apreció ninguna modificación en la expresión del resto de las citocinas.
- 2) Cuando la temperatura se elevó a 40 °C, la adición de cisplatino provocó un intenso descenso en la expresión de IL-6 (30%) y MIP-2 (40%), la práctica desaparición de la expresión de G-CSF (5%), KC (5%), RANTES (10%), TIMP-1 (5%) y sTNF-R (5%) y la desaparición total de la expresión de IL-10, MCP-1 y MCP-5.
- 3) Cuando la temperatura se elevó a 42 °C, en presencia de cisplatino, no se apreciaron modificaciones respecto a lo ocurrido en el grupo anterior.

En la gráfica 2 se muestran las determinaciones registradas en los porcentajes de expresión de las citocinas en las diferentes condiciones de temperatura a 37, 40 y 42 °C, a las que fueron sometidos los sobrenadantes de los cultivos celulares tras la adición de cisplatino a dosis de 33,7 µg/ml.

El compendio del análisis de la expresión de citocinas por las células pleurales en cada uno de los grupos experimentales y la significación estadística de las variaciones observadas en su expresión en las distintas condiciones experimentales, aparecen reflejadas en las gráficas 3 y 4.

12.2.- Determinación de la producción de apoptosis y necrosis celular

El análisis de las muestras del cultivo celular sometidas a temperatura de 37 °C durante 120 minutos, mostró la presencia de 2,90% de células en apoptosis (Anexina V + / Ioduro de Propidio -) y de 16,81% de células necrosadas (Anexina V +/- / Ioduro de Propidio +). A 40 °C durante el mismo tiempo, se objetivó la presencia de 5,46% de células en apoptosis y de 17,90% de células necrosadas. A temperatura de 42 °C durante 120 minutos se comprobó la presencia de 6,27% de células en apoptosis y de 15,59% de células necrosadas (Gráfica 5).

Cuando durante el mismo tiempo e idénticas condiciones de temperatura las muestras fueron tratadas con cisplatino a dosis de 33,7 µg/ml, los resultados fueron los siguientes (Gráfica 6): A 37 °C se comprobó la presencia de 7,86% de células en apoptosis y 23,49% de células necrosadas. A 40 °C, 14,10% de células en apoptosis y 30,77% de células necrosadas. A 42 °C, 15,05% de células en apoptosis y 25,82% de células necrosadas.

El compendio del análisis del porcentaje de células en apoptosis y necrosadas en cada uno de los grupos experimentales y la significación estadística de las variaciones observadas en los porcentajes en las distintas condiciones experimentales, aparecen reflejadas en las gráficas 7, 8 y 9.

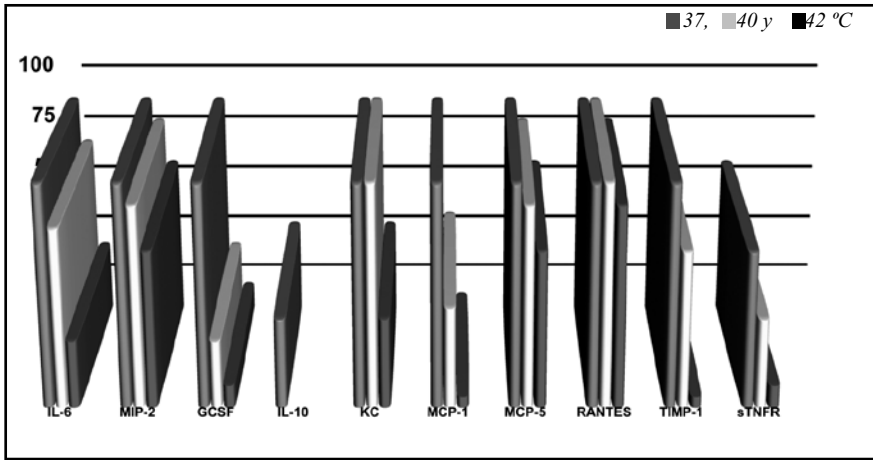
12.3.- Dinámica de expresión de Anexina V-FITC (células en apoptosis) y de Tinción con ioduro de propidio (necrosis celular)

Discreta elevación del número de eventos y cambios respecto al control de la intensidad de la señal de fluorescencia, traductora de la detección de la producción de apoptosis (desplazamiento hacia la izquierda de la curva de registro) a 37, 40 y 42 °C. Diferencia entre la morfología de las curvas obtenidas tras someter al cultivo celular a temperaturas de 37 °C y la hallada tras la elevación de la temperatura a 40 y 42 °C. Constatación de un menor desplazamiento de la curva hacia la izquierda y de la producción de un mayor número de eventos que en el caso de las células sometidas a temperaturas de 37 °C, datos en concordancia con los constatados en el preliminar análisis porcentual de la producción de apoptosis (Gráfica 10).

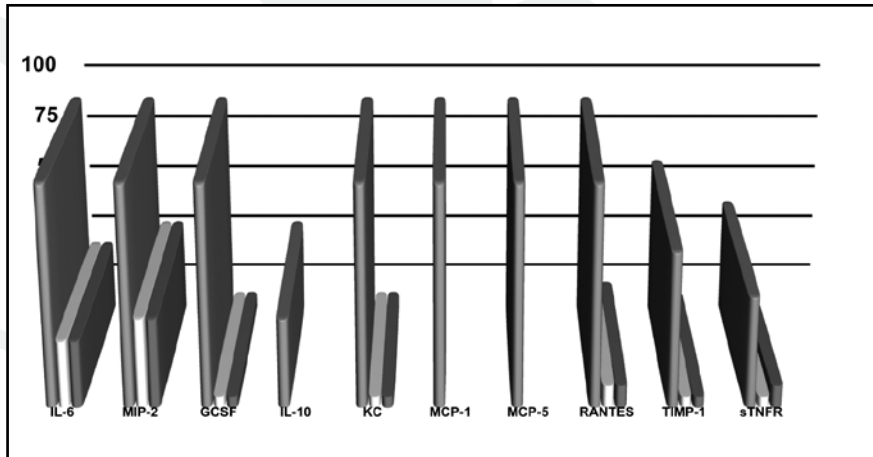
Tras la adición a la muestra de cisplatino, detección de incremento de la intensidad de fluorescencia respecto al control a 37, 40 y 42 °C. Producción en todos los casos de un desplazamiento hacia la derecha de la curva de fluorescencia, traductora de la expresión de producción de necrosis celular. Incremento progresivo del registro del número de eventos con la elevación de la temperatura de 37 a 40 y a 42 °C (Gráfica 10).



13.- GRÁFICAS



Gráfica 1: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C).



Gráfica 2: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C) y la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).



Gráfica 3: Expresión de citocinas en las células pleurales (%).
Modulación por la temperatura y el cisplatino

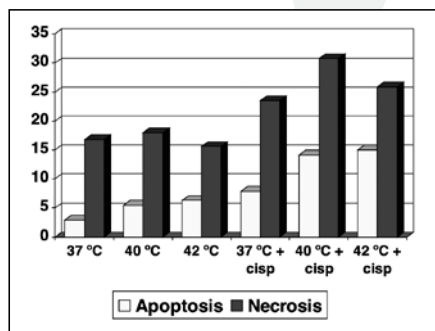
| Citocinas | Modulación térmica | | | Adición de cisplatino (33,7 µg/ml) | | |
|-----------|--------------------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|
| | 37 °C | 40 °C | 42 °C | 37 °C | 40 °C | 42 °C |
| IL-6 | 100 | 80 | 30 | 100 | 30 | 30 |
| MIP-2 | 100 | 90 | 70 | 100 | 40 | 40 |
| G-CSF | 100 | 30 | 30 | 100 | 5 | 5 |
| IL-10 | 40 | -- | -- | 40 | -- | -- |
| KC | 100 | 100 | 40 | 100 | 5 | 5 |
| MCP-1 | 100 | 45 | 5 | 100 | -- | -- |
| MCP-5 | 100 | 90 | 70 | 100 | -- | -- |
| RANTES | 100 | 100 | 90 | 100 | 10 | 10 |
| TIMP-1 | 100 | 75 | 5 | 70 | 5 | 5 |
| sTNF-R | 70 | 40 | 10 | 50 | 5 | 10 |

Gráfica 4: Expresión de citocinas en las células pleurales (%).
Modulación por la temperatura

| 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 |

Gráfica 5: Apoptosis y necrosis de las células pleurales (%).
Modulación por la temperatura

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



Gráfica 6: Porcentaje de células pleurales en apoptosis y necrosis en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C), sin y con la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).

Gráfica 7: Apoptosis de las células pleurales (%).
Modulación por la temperatura y el cisplatino.

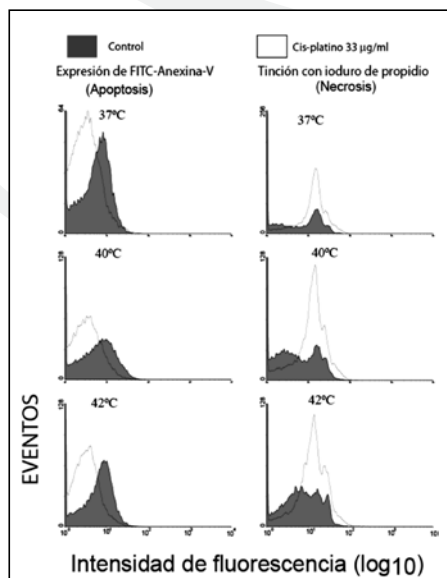
| Temperatura | Apoptosis T | Apoptosis T+CP (33,7 µg/ml) | % Incremento | p |
|-------------|----------------|-----------------------------------|-----------------|-------|
| 37 °C | 2,90 | 7,86 | 271 | 0,347 |
| 40 °C | 5,46 | 14,10 | 258 | 0,117 |
| 42 °C | 6,27 | 15,05 | 240 | 0,347 |

Gráfica 8: Porcentaje de células pleurales necrosadas en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C) sin y con la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).

| Temperatura | Necrosis T | Necrosis 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 |

Gráfica 9: Apoptosis y necrosis de las células pleurales (%).
Modulación por la temperatura .

| 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 |



Gráfica 10: Expresión dinámica de apoptosis y necrosis celular en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C), sin y con la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).

14.- CONCLUSIONES

Debido a la similitud entre las proteínas del ratón y sus equivalentes proteicos en el hombre, la utilización de un modelo experimental murino, como el diseñado, permite la obtención de las células pleurales necesarias, con facilidad y en condiciones cualitativas y cuantitativas suficientes, para la realización de un estudio como el presentado.

La metodología fijada para el estudio *in vitro* de las células pleurales permite analizar con fiabilidad en el cultivo celular la expresión de proteínas proinflamatorias y la apoptosis y necrosis celular inducidas por la hipertermia y la adición de un quimioterápico como cisplatino.

La elección de un array conteniendo distintas proteínas con posible expresión por las células pleurales murinas y la posibilidad de la simultaneidad en su detección, permite determinar la interacción de las proteínas halladas durante las distintas fases del experimento, su variación a lo largo del mismo y su correspondencia con los cambios observados en la dinámica de la producción de apoptosis y muerte celular.

Conociendo la naturaleza de las distintas familias de citocinas, se puede afirmar que la respuesta de las células pleurales al choque térmico, permite el mantenimiento en altos niveles de expresión de distintas proteínas con marcado carácter proinflamatorio como MIP-2, KC, MCP-5 y RANTES, con alto poder quimioatrayente sobre los polimorfonucleares y activadoras de monocitos y macrófagos y la disminución de proteínas inhibitoras de la síntesis de otras citocinas antiinflamatorias (IL-10), o de la actividad proinflamatoria de la célula (sTNF-R). Teniendo en cuenta su acción, las variaciones en su expresión podrían estar en relación con la puesta en marcha de mecanismos de regulación de la estructura y viabilidad celular como respuesta a la hipertermia.

La elevación de la temperatura del medio de cultivo a 42 °C disminuye de forma acentuada la mayor parte de las citocinas con marcada expresión a 40 °C, aunque proteínas proinflamatorias como MIP-2, MCP-5 y RANTES con acción quimioatrayente de monocitos y macrófagos se mantienen a esta temperatura en rangos de expresión elevados. Estos hechos están en concordancia con el porcentaje observado de células con pérdida de su actividad vital y su ulterior fagocitosis por los monocitos y macrófagos.

Tras añadir al cultivo celular cisplatino, se observa un marcado descenso con la hipertermia de la expresión celular proteica a medida que se eleva la temperatura. La elevación de la temperatura del cultivo celular a 40 °C y 42 °C, revela la progresiva desaparición de la práctica totalidad de las proteínas, restando tan sólo como considerable una discreta expresión de IL-6 (30%) y de MIP-2 (40%). En definitiva, la adición del citostático anula progresivamente y a medida que se eleva la temperatura la producción de citocinas por las células pleurales y su desaparición conlleva a investigar el estado real de éstas tras la administración del citostático.

A 37 °C se observa en el cultivo un escaso porcentaje de células en apoptosis, pero éste inicia su incremento cuando las condiciones térmicas del sobrenadante se elevan a 40 °C. La adición de cisplatino al sobrenadante produce un claro incremento del porcentaje de células en apoptosis y necrosis que se hace porcentual y dinámicamente más patente a medida que se eleva la temperatura de 37 a 42 °C.

Una concentración de 33,7 µg/ml de cisplatino, como la dosis de citostático añadida a las muestras de células pleurales sometidas a temperaturas de 37 °C, 40 °C y 42 °C, ha permitido corroborar su capacidad para incrementar el grado de apoptosis y necrosis celular a medida que se eleva la temperatura. Los resultados obtenidos permiten reafirmar la idoneidad de la concentración activa de cisplatino de 33,7 µg/ml en el líquido de lavado pleural como idónea.

El conocimiento de la dinámica de acción sobre las células pleurales de la hipertermia y la quimioterapia puede verse reforzado por el de la reacción celular proinflamatoria inducida por estos agentes y la relación entre la expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis celular.

Las variaciones observadas en la expresión proteica de las células pleurales ante el estímulo térmico y citostático podrían convertirse en una vía de señalización de la viabilidad celular tras la aplicación de los estímulos terapéuticos estudiados, hipertermia y quimioterapia, y su sinergia en la acción.

La trascendencia de estos hallazgos y su posible aplicación a nuevos diseños y estrategias de aplicación clínica de la quimioterapia intrapleural hipertérmica, debería ser definitivamente fijada mediante la ampliación de estas investigaciones tanto en células mesoteliales normales como neoplásicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Van Ruth S, Baas P, Haas RL, Rutgers EJ, Verwaal VJ, Zoetmulder FA.** Cytoreductive surgery combined with intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy for stage I malignant pleural mesothelioma. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 176-182.
2. **McQuellon RP, Loggie BW, Lehman AB, Russell GB, Fleming RA, Shen P, Levine EA.** Long-term survivorship and quality of life after cytoreductive surgery plus intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 155-162.
3. **De Bree E, Rosing H, Filis D, Romanos J, Melissourgaki M, Daskalakis M, Pilatou M, Sanidas E, Taflampas P, Kalbakis K, Beijnen JH, Tsiftsis DD.** Cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel: a clinical and pharmacokinetic study. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1183-1192.
4. **Chang MY, Sugarbaker DJ.** Innovative therapies: intraoperative intracavitary chemotherapy. *Thorac Surg Clin* 2004; 14: 549-556.
5. **Rusch VW, Niedzwiecki D, Tao Y, Menendez-Botet C, Dnistrian A, Kelsen D, Saltz L, Markman M.** Intrapleural cisplatin and mitomycin for malignant mesothelioma following pleurectomy: pharmacokinetic studies. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1001-1006.
6. **Christophi C, Winkworth A, Muralidharan V, Evans P.** The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surg Oncol* 1998; 7: 83-90.
7. **Smythe WR, Mansfield PF.** Hyperthermia: Has its time come?. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 210-212.
8. **Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P.** Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol* 2003; 171: 3426-3434.
9. **Galfy G, Mohammed KA, Nasreen N, Ward MJ, Antony VB.** Inhibition of interleukin-8 reduces human malignant pleural mesothelioma propagation in nude mouse model. *Oncol Res* 1999; 11: 187-194.
10. **Celis JE, Gromov P, Cabezón T, Moreira JM, Ambartsumian N, Sandelin K, Rank F, Gromova I.** Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 327-344.
11. **Wang CC, Huang RP, Sommer M, Lisoukov H, Huang R, Lin Y, Miller T, Burke J.** Array-based multiplexed screening and quantitation of human cytokines and chemokines. *J Proteome Res* 2002; 1: 337-343.
12. **Wang NS.** Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998; 19: 229-240.
13. **Bernaudin JF, Fleury J.** Histologie et cytopathologie de la plèvre. *Encycl Méd Chir* (Paris, France), Poumon, 6040 R10, 9-1986, 6 p.
14. **Segado Soriano A, Rodríguez Panadero F.** Fisiopatología de la pleura: Manejo del derrame pleural. En Caminero Luna JA, Fernández Fau L, Editores. *Manual de Neumología y Cirugía Torácica*. Editores Médicos SA. Madrid 1998, págs 1671-1684.
15. **Zlotnik A, Yoshie O.** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.
16. **Antony VB.** Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 539-544.
17. **Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P.** Diffuse pleural malignant mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 1960; 17: 260-271.
18. **Pass HI.** Malignant pleural mesothelioma: surgical roles and novel therapies. *Clin Lung Cancer* 2001; 3: 102-117.
19. **Ruffie P, Feld R, Minkin S, Cormier Y, Boutan-Laroze A, Ginsberg R, Ayoub J, Shepherd FA, Evans WK, Figueredo A.** Diffuse malignant mesothelioma of the pleura in Ontario and Quebec: a retrospective study of 332 patients. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1157-1168.
20. **All About Malignant Mesothelioma:** Your Mesothelioma Information Source™. © 2005-2007 Ceatus Media Group LLC. <http://www.allaboutmalignantmesothelioma.com>
21. **Clarke PG.** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181: 195-213.
22. **Dietzel F.** Basic principles in hyperthermic tumor therapy. *Recent Results Cancer Res* 1983; 86: 177-190.

23. **Hildebrandt B, Wust P.** Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Res* 2007; 134: 185-193.
24. **Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, Hara M, Tomita M, Ayabe T, Onitsuka T.** Intrapleural hyperthermic perfusion with chemotherapy increases apoptosis in malignant pleuritis. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 1769-1773.
25. **Bergs JW, Haveman J, Ten Cate R, Medema JP, Franken NA, Van Bree C.** Effect of 41 degrees C and 43 degrees C on cisplatin radiosensitization in two human carcinoma cell lines with different sensitivities for cisplatin. *Oncol Rep* 2007; 18: 219-226.
26. **Liang H, Zhan HJ, Wang BG, Pan Y, Hao XS.** Change in expression of apoptosis genes after hyperthermia, chemotherapy and radiotherapy in human colon cancer transplanted into nude mice. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4365-4371.
27. **Sugarbaker PH.** Laboratory and clinical basis for hyperthermia as a component of intracavitary chemotherapy. *Int J Hyperthermia* 2007; 23: 431-442.
28. **Yu DY, Matsuya Y, Zhao QL, Ahmed K, Wei ZL, Nemoto H, Kondo T.** Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of furan-fused tetracyclic compounds. *Apoptosis* 2007; 12: 1523-1532.
29. **Ahmed K, Zhao QL, Matsuya Y, Yu DY, Salunga TL, Nemoto H, Kondo T.** Enhancement of macrophelide-induced apoptosis by mild hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2007; 23: 353-361.
30. **Cui ZG, Kondo T, Matsumoto H.** Enhancement of apoptosis by nitric oxide released from alpha-phenyl-tert-butyl nitron under hyperthermic conditions. *J Cell Physiol* 2006; 206: 468-476.
31. **Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H.** The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 2006; 7: 243.
32. **Baggiolini M, Loetscher P.** Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 418-420.
33. **Gallin JI, Farber JM, Holland SM, Nutman TB.** Interferon-gamma in the management of infectious diseases. *Ann Intern Med* 1995; 123: 216-224.
34. **Gross PL, Aird WC.** The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 463-478.
35. **Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG.** Systemic inflammation after trauma. *Injury* 2007; 38: 1336-1345.
36. **Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR.** Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-190.
37. **Zissel G, Schlaak J, Schlaak M, Müller-Quernheim J.** Regulation of cytokine release by alveolar macrophages treated with interleukin-4, interleukin-10, or transforming growth factor beta. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7: 59-66.
38. **Dellinger RP.** Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1259-1265.
39. **Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S.** Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 1205-1208.
40. **Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ.** CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 315-319.
41. **Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki H, Mayumi M, Ohshima Y.** Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol* 2002; 169: 4861-4866.
42. **Sarafi MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, Charo IF, Luster AD.** Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 1997; 185: 99-109.
43. **Hornebeck W.** Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol (Paris)* 2003; 51: 569-573.
44. **Sherry B, Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, Davatelis G, Wolpe SD, Masiarz F, Coit D, Cerami A.** Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J Exp Med* 1988; 168: 2251-2259.
45. **Pelus LM, Fukuda S.** Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Exp Hematol* 2006; 34: 1010-1020.



- 46. Grimaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ.** Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 2007; 8: 1095-1104.
- 47. Frink M, Hsieh YC, Hsieh CH, Pape HC, Choudhry MA, Schwacha MG, Chaudry IH.** Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. *Shock* 2007; 28: 576-581.
- 48. Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, Marzi I.** Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock* 2007; 28: 668-674.

