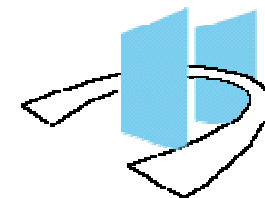
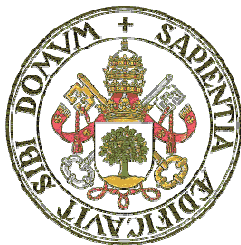


Efectos de la Hipertermia y la Quimioterapia sobre las células mesoteliales pleurales

Bases de su aplicación en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno

Félix Heras, Begoña Gregorio, José M^a Matilla, Nieves Fernández, Sara de Cabanyes, Angel Cilleruelo, Mariano Sánchez-Crespo, Guillermo Ramos, Mariano García-Yuste
Servicio de Cirugía Torácica
Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)
Universidad de Valladolid



Uso combinado de Hipertermia y Quimioterapia*

Tratamiento de procesos oncológicos complejos**

Carcinomatosis pleural

Carcinomatosis peritoneal

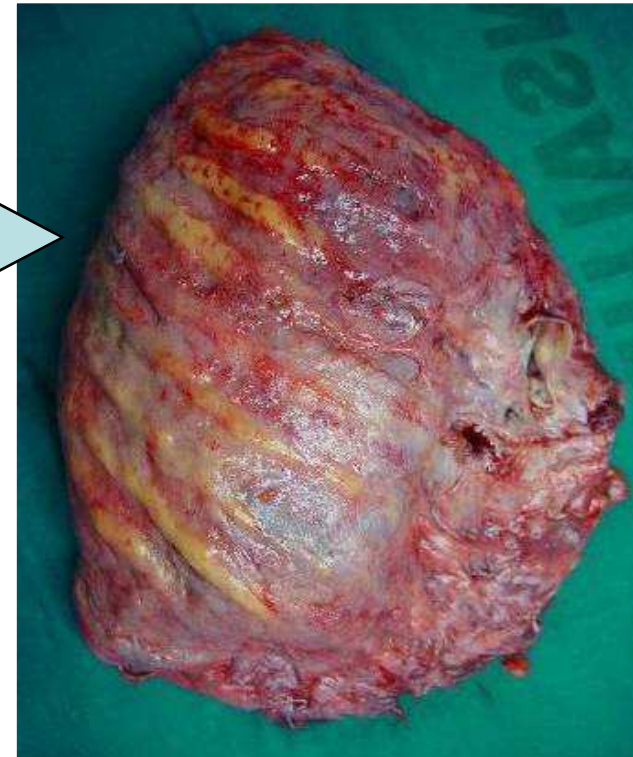
Mesotelioma pleural maligno

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

Uso combinado de Hipertermia y Quimioterapia

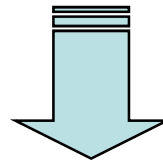
Fundamentos de su aplicación

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

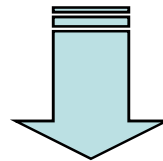
* Chang MY. Thorac Surg Clin 2004; 14: 549-556

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

Uso combinado de Hipertermia y QT intrapleurales



resulta empírico



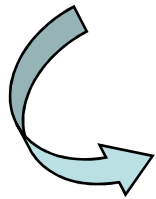
Los mecanismos de actuación no están claramente definidos

Uso combinado de Hipertermia y QT intrapleurales

Bases de su planteamiento*

1. Funciones celulares

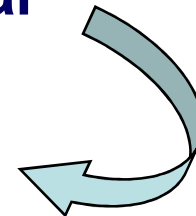
proliferación, diferenciación, mantenimiento y muerte



Controladas por genes y vías de señalización

2. Apoptosis, angiogénesis e interacción celular

Reguladas por citocinas



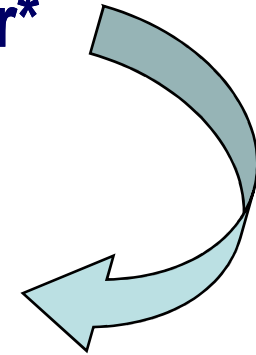
* Potian JA. J Immunol 2003; 171: 3426-3434

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

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

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**

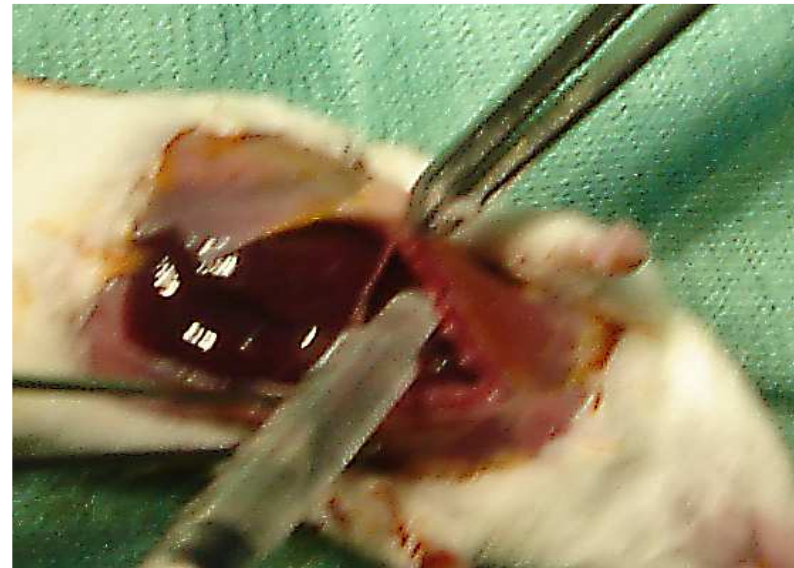
6 grupos de 15 animales por experimento

Diseño experimental

Obtención de células pleurales

Procedimiento 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

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

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

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

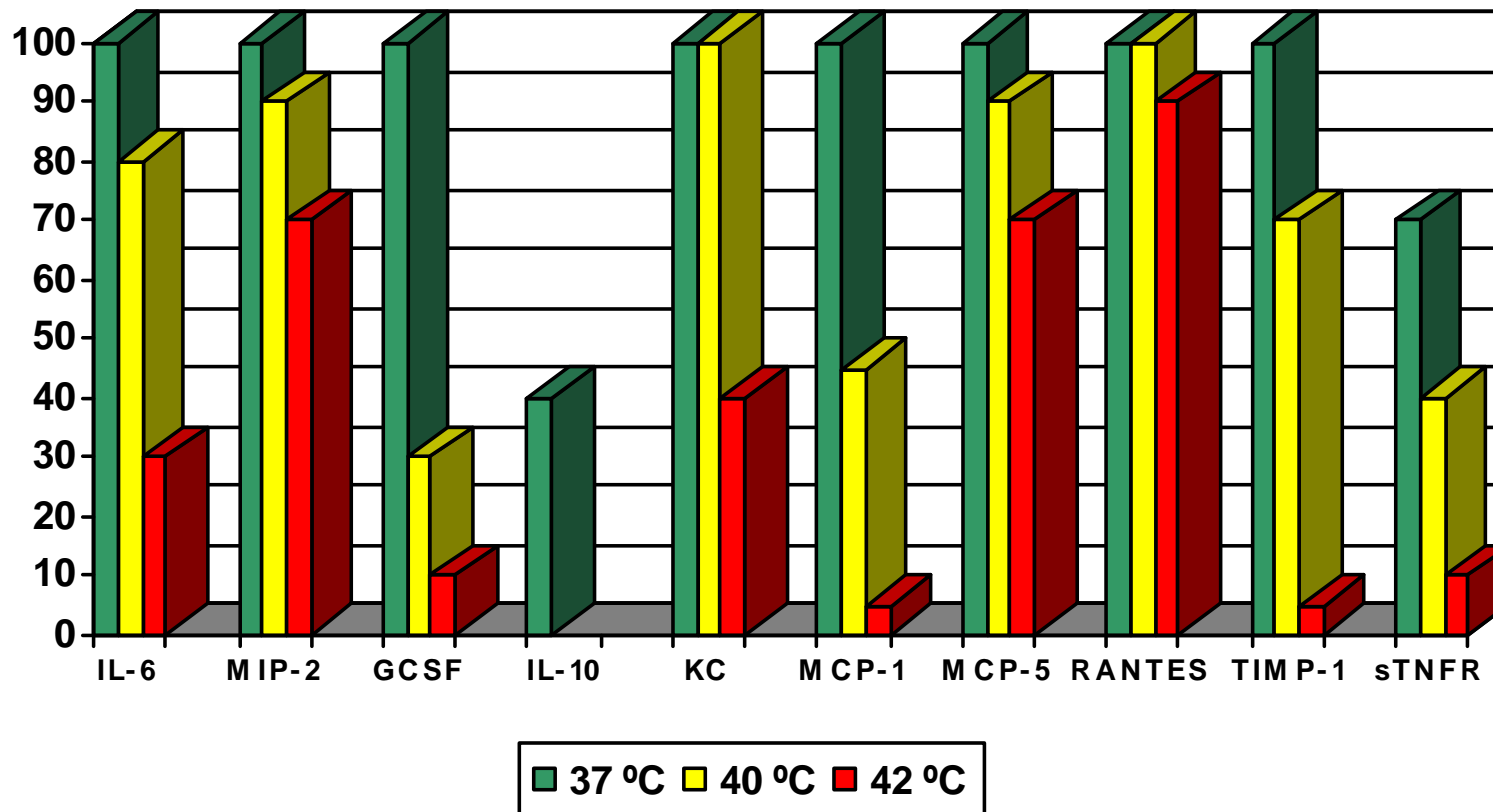
Prueba H de suma de rangos de Kruskal-Wallis

3. Significación estadística $p < 0,05$

Resultados

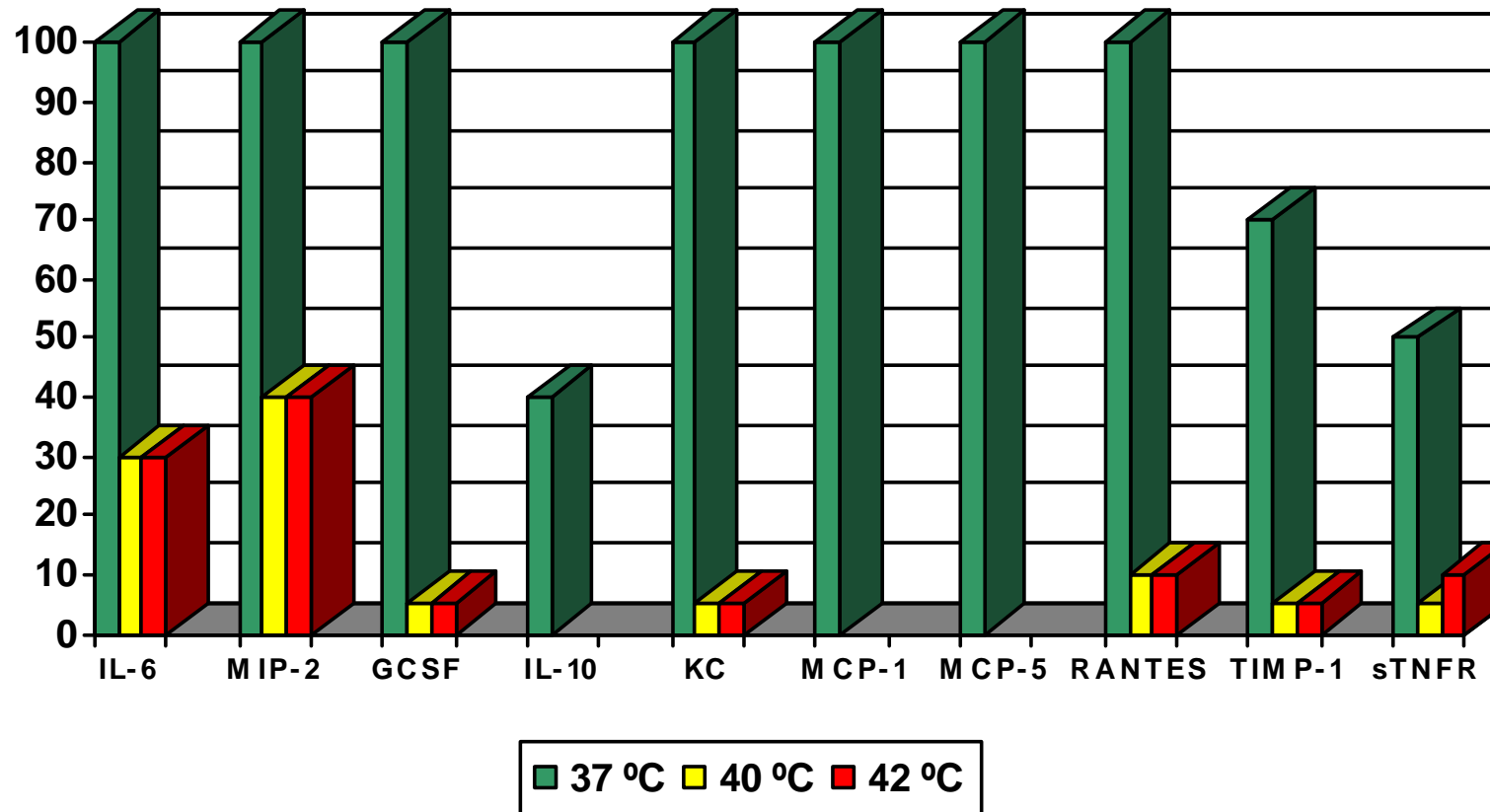
Síntesis de proteínas proinflamatorias

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



Síntesis de proteínas proinflamatorias

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



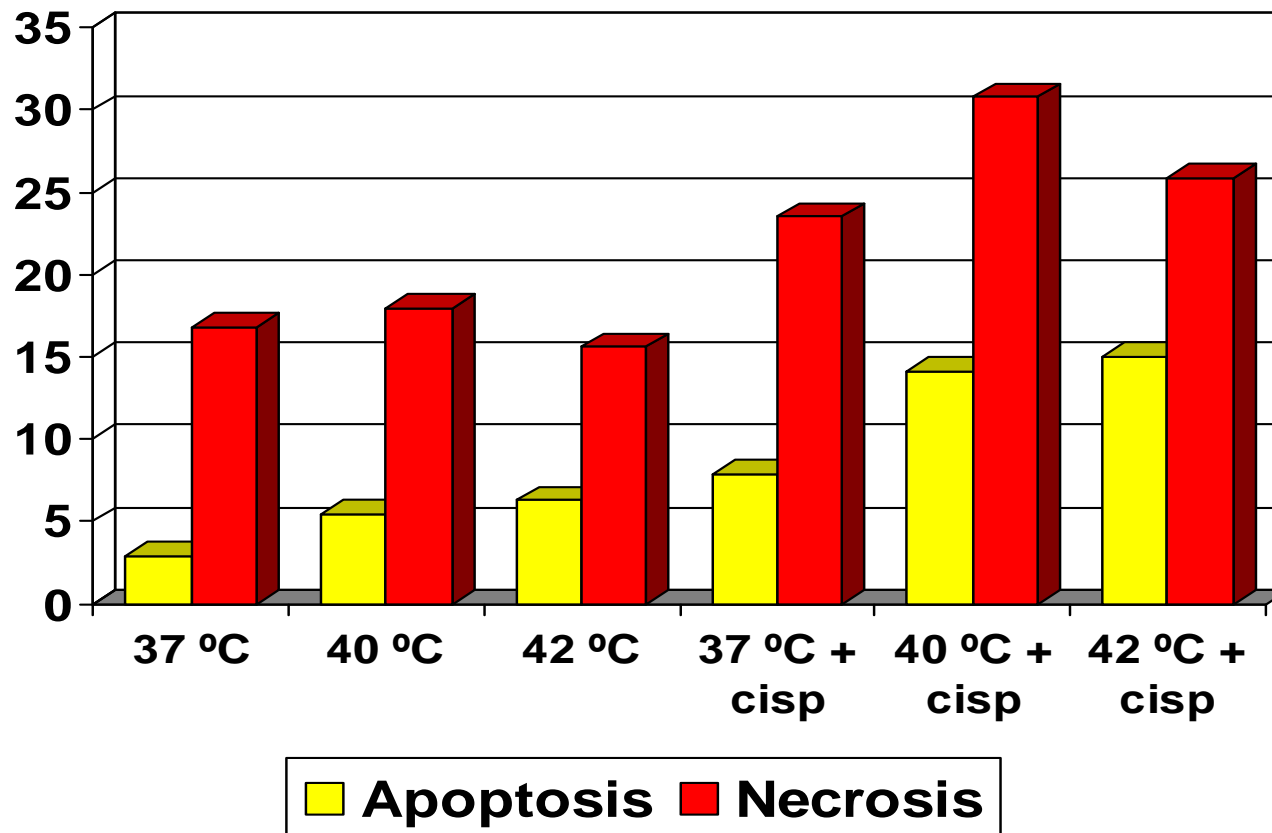
Síntesis de proteínas proinflamatorias

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

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

Conclusiones

1.- La respuesta de las células mesoteliales al choque térmico permite el mantenimiento en altos niveles de expresión de proteínas proinflamatorias (MIP-2, KC, MCP-5 y RANTES) con alto poder atrayente de polimorfonucleares y macrófagos y la disminución de proteínas inhibidoras de la síntesis de citocinas antiinflamatorias (IL-10) o de la actividad proinflamatoria de la célula (sTNF-R)

2.- La elevación de la temperatura a 42 °C disminuye la mayor parte de las citocinas expresadas 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

3.- Al añadir cisplatino a dosis de 33,7 µg/ml se observa un marcado descenso de la expresión celular proteica, más evidente a medida que se eleva la temperatura

4.- Al elevar la temperatura de 37 a 40 °C se comprueba un incremento progresivo de la apoptosis celular. La adición de cisplatino a dosis de 33,7 µg/ml incrementa aún más el porcentaje de células en apoptosis y necrosis siendo más evidente al incrementar la temperatura

5.- Las variaciones observadas en la expresión proteica de las células mesoteliales pleurales ante los estímulos térmico y citostático podrían convertirse en una vía de señalización de la viabilidad celular tras la aplicación de cisplatino en condiciones de hipertermia