



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA  
CÁTEDRA DE CIRUGÍA TORÁCICA**

**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTOS DE LA HIPERTERMIA Y LA QUIMIOTERAPIA  
INTRAPLEURALES. BASES DE SU APLICACIÓN EN EL  
TRATAMIENTO DE LAS NEOPLASIAS PLEURALES  
MALIGNAS**

**Félix Heras Gómez**

**Valladolid 2008**



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Cirugía, Oftalmología,  
Otorrinolaringología y Fisioterapia

D. Guillermo Ramos Seisdedos, Catedrático de Cirugía Torácica de la  
Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

y

D. Mariano García-Yuste Martín, Profesor Titular de Cirugía Torácica de la  
Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

**CERTIFICAN**

Que el trabajo **“Efectos de la hipertermia y la quimioterapia intrapleurales. Bases de su aplicación en el tratamiento de las neoplasias pleurales malignas”**, realizado bajo su dirección por D. Félix Heras Gómez, reúne los méritos suficientes y la originalidad necesaria para su lectura y defensa públicas, a fin de optar al Título de Doctor en Medicina por esta Universidad.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente escrito en Valladolid a 8 de julio de 2004.

Prof. G. Ramos

Prof. M. García-Yuste

**Trabajo presentado por D. Félix Heras Gómez 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**

**Valladolid 2008**

**Lo imposible deja de serlo cuando abrimos la mente a nuevas posibilidades.**

“La búsqueda constante de nuevas asociaciones constituye, de manera consciente o inconsciente, uno de los rasgos distintivos de toda investigación científica. Uno no trata de resolver el problema de una sola vez, sino que comienza descubriendo pequeñas conexiones, luego trata de encajarlas y finalmente descubre de repente que una pieza encaja con otras cinco y se siente embargado por una alegría indescriptible”.

**Chen Ning Yang (1922 - )**

Premio Nobel de Física 1957 por su trabajo "Sobre la violación del principio de conservación de la paridad en las interacciones débiles de las partículas elementales".

Citado en:

Root-Bernstein R, Root-Bernstein M. El secreto de la creatividad. (Primera edición, febrero 2002). Editorial Kairós, Barcelona 2002, pp 135.

# **Dedicatoria**

A Laura, por todo

A Henar, en el recuerdo

A mis padres, porque se lo debía

A Félix, ¿ ...? una incógnita aún por descifrar

A Eduardo y Juan Manuel, que van a ser los continuadores

A los pacientes, que sin saberlo, son el estímulo de nuestra superación

# **Agradecimientos**

Al Prof. Dr. D. José María Beltrán de Heredia y Onís (†) que en el año 1972 me aceptó como Alumno Interno en su Cátedra de Patología Quirúrgica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y me permitió realizar mi sueño de ser cirujano.

Al Prof. Dr. D. Guillermo Ramos Seisdedos que me aceptó como colaborador en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y ha contribuido a lograr que sea *“exponente de una generación que tiene sobre sí la inexcusable responsabilidad de “hacer” la Cirugía Torácica del mañana”(\*)*. Espero haber conseguido su propuesta de *“elevar día a día nuestro quehacer diario [...], lo mejor que podemos transmitir a residentes, internos y alumnos, objeto directo de nuestra atención docente”(\*\*)*.

Al Prof. Dr. D. Mariano García-Yuste Martín, ejemplo admirable de tenacidad y responsable directo, gracias a su constante estímulo, de que este trabajo se haya podido realizar.

Al Prof. Dr. D. Mariano Sánchez Crespo, a la Dra. D<sup>a</sup> Nieves Fernández García y a sus colaboradores del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), de la Universidad de Valladolid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por su desinteresada ayuda y su comprensión durante la realización de los experimentos.

A los miembros del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Drs.: D. José María Matilla González, D<sup>a</sup> Begoña Gregorio Crespo, D<sup>a</sup> Sara de Cabanyes Candela y D. Angel Cilleruelo Ramos, por su inestimable participación en la realización de este trabajo, principalmente en la fase experimental.

A todos los miembros del Departamento de Cirugía (docente y asistencial), porque con el contacto diario, en el transcurso de los años, han contribuido a aumentar mi bagaje de conocimientos y experiencias.

A todos aquellos que, directa o indirectamente, han aportado su ayuda para conseguir este objetivo.

(\*) Dedicatoria personal e (\*\*) introducción en el libro “La Cirugía Torácica y el Cirujano” del discurso de ingreso como Académico de Número de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid del Prof. Dr. D. Guillermo Ramos Seisdedos. Sever Cuesta, Valladolid 1986.

# Índices

## Índice general

Portada	i
Certificado	ii
Dedicatoria	vi
Agradecimientos	viii
Índices	xi
Índice general	xii
Índice de abreviaturas y acrónimos	xvi
<b>A.- Planteamiento del tema</b>	<b>1</b>
1.- Introducción	2
2.- La pleura	4
2.1.- Concepto	4
2.2.- Descripción anatómica	4
2.3.- Embriología	5
2.4.- Citohistología	6
2.5.- Fisiopatología	9
3.- Neoplasias pleurales	12
3.1.- Introducción	12
3.2.- Tumores pleurales primitivos	12
3.2.1.- Tumores pleurales localizados	13
3.2.2.- Mesotelioma pleural difuso	13
3.2.2.1.- Epidemiología	13
3.2.2.2.- Etiología	14
3.2.2.3.- Factores biológicos e inmunológicos	16
3.2.2.4.- Histología	17
3.2.2.5.- Sintomatología clínica	18
3.2.2.6.- Diagnóstico	21
3.2.2.6.1.- Métodos de imagen	21
3.2.2.6.2.- Estudio del líquido pleural	22
3.2.2.6.3.- Biopsia pleural	23
3.2.2.7.- Estadificación	24
3.2.2.8.- Pronóstico	25
3.2.2.9.- Tratamiento convencional	26
3.2.2.9.1.- Cirugía	27
3.2.2.9.1.1.- Pleurectomía	27
3.2.2.9.1.2.- Pleuroneumectomía	27
3.2.2.9.1.3.- Cirugía paliativa	29
3.2.2.9.2.- Radioterapia	29
3.2.2.9.3.- Quimioterapia	30
3.2.2.10.- Nuevos tratamientos	31
3.2.2.10.1.- Tratamientos multimodales	32
3.2.2.10.2.- Inmunoterapia	33
3.2.2.10.3.- Terapia génica	34
3.2.2.10.4.- Terapia fotodinámica	36
3.2.2.10.5.- Quimioterapia intrapleural	37

3.3.- Tumores pleurales secundarios	37
3.3.1.- Etiología	38
3.3.2.- Patogenia	38
3.3.3.- Sintomatología	39
3.4.- Derrames pleurales malignos	39
3.4.1.- Concepto	39
3.4.2.- Etiología	40
3.4.3.- Patogenia	40
3.4.4.- Sintomatología	42
3.4.5.- Diagnóstico	43
3.4.5.1.- Métodos de imagen	43
3.4.5.2.- Toracocentesis	45
3.4.5.3.- Estudio del líquido pleural	46
3.4.5.4.- Toracoscopía y videotoracoscopía	47
3.4.6.- Pronóstico	48
3.4.7.- Tratamiento	49
4.- Mecanismos de la muerte celular. Modulación por agentes terapéuticos	53
4.1.- Necrosis y apoptosis	53
4.1.1.- Introducción	53
4.2.- Necrosis	54
4.2.1.- Concepto	54
4.2.2.- Características morfológicas y bioquímicas	54
4.3.- Apoptosis	55
4.3.1.- Concepto	55
4.3.2.- Características morfológicas y bioquímicas	57
4.3.3.- Mecanismos desencadenantes de la apoptosis	58
4.3.4.- Fases de la apoptosis	59
4.3.5.- Vías de activación de la apoptosis	60
4.3.5.1.- Vía extrínseca o de receptores de muerte	60
4.3.5.2.- Vía intrínseca o mitocondrial	61
4.3.6.- Caspasas	62
4.3.7.- Familia de proteínas Bcl-2	64
4.3.8.- Interacción entre las vías mediadoras de apoptosis	66
4.3.9.- Implicación de la mitocondria en la apoptosis	67
4.3.10.- Inhibidores y reguladores de la apoptosis	68
4.3.10.1.- Proteínas inhibidoras de la apoptosis	68
4.3.10.2.- Proteínas de choque térmico	68
4.3.10.3.- Gen p53	69
5.- Hipertermia en Oncología	70
5.1.- Hipertermia	70
5.2.- Utilidad de la hipertermia en Oncología	71
5.3.- Radioterapia y Quimioterapia hipertérmicas	73
6.- Muerte celular inducida por agentes terapéuticos	75
7.- Técnicas para la detección de muerte celular	77
7.1.- Microscopía	77
7.2.- Detección de la degradación del ADN por electroforesis	78
7.3.- Técnicas de inmunohistoquímica	79
7.4.- Citometría de flujo	79
7.5.- Evaluación de la simetría de la membrana celular	80
7.5.1.- Anexina V	80
7.5.2.- Ioduro de propidio	81

8.- Mecanismos de señalización biomolecular del daño celular	82
8.1.- Citocinas	82
8.1.1.- Definición y características	82
8.1.2.- Clasificación	83
8.1.3.- Funciones biológicas y propiedades	84
8.1.4.- Receptores de citocinas	85
8.1.5.- Receptores solubles de citocinas	86
8.1.6.- Quimiocinas	87
8.1.6.1.- Clasificación	88
8.1.6.2.- Receptores de quimiocinas	91
8.2.- Citocinas e inflamación	92
8.3.- Citocinas relacionadas con la inflamación	94
8.4.- Métodos de detección de citocinas	98
9.- Quimioterapia hipertérmica intrapleural	99
<b>B.- Hipótesis de trabajo</b>	<b>103</b>
<b>C.- Material y métodos</b>	<b>105</b>
1.- Instrumentación	106
1.1.- Laboratorio de Cirugía Experimental	106
1.2.- Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)	107
2.- Diseño experimental	108
2.1.- Animales de experimentación	108
2.2.- Obtención de las células pleurales	108
2.2.1.- Procedimiento anestésico	108
2.2.2.- Procedimiento quirúrgico y obtención de células	109
2.3.- Transporte de las muestras. Restricciones de aceptación	110
3.- Determinaciones en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular	111
3.1.- Recogida de células mesoteliales y macrófagos pleurales	111
3.2.- Establecimiento de grupos experimentales de estudio	112
3.3.- Determinaciones en los grupos de estudio establecidos	113
3.3.1.- Estudio de liberación de proteínas proinflamatorias	113
3.3.1.1.- Elección del sistema de determinación	113
3.3.1.2.- Metodología	114
3.3.1.3.- Detección de señales. Análisis de datos	114
3.3.2.- Estudio de la apoptosis y la necrosis celular	115
3.3.2.1.- Soluciones empleadas	115
3.3.2.2.- Metodología	115
4.- Tratamiento estadístico	117
<b>D.- Resultados</b>	<b>118</b>
1.- Determinación de la producción de proteínas proinflamatorias	119
2.- Determinación de la producción de apoptosis y necrosis celular	120
2.1.- Análisis porcentual	120
2.2.- Dinámica de expresión	121
2.2.1.- Expresión de AnexinaV-FITC (células en apoptosis)	121
2.2.2.- Tinción con yoduro de propidio (necrosis celular)	122
<b>E.- Compendio de los resultados</b>	<b>124</b>

---

<b>F.- Discusión de los resultados</b>	145
1.- ¿Es necesaria la investigación de nuevos modelos terapéuticos para las neoplasias pleurales malignas?	146
2.- ¿Cuál es el modelo experimental idóneo para intentar dar respuesta al problema planteado? Idoneidad del procedimiento	150
3.- Elección del citostático. Interacción sinérgica del calor con agentes antineoplásicos. Mecanismos de actuación	153
4.- ¿Cuál es la temperatura idónea en la realización del procedimiento y cuál la concentración de cisplatino?	157
5.- ¿En qué condiciones se podría intentar establecer la relación entre la expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis celular en las células mesoteliales tratadas con quimioterapia hipertérmica?	161
6.- ¿Cómo se modifica en la célula mesotelial la expresión de distintas citocinas con los cambios de temperatura?	166
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?	168
<b>G.- Conclusiones</b>	172
<b>H.- Bibliografía</b>	176
<b>I.- Tablas</b>	199
<b>J.- Iconografía</b>	215

## Índice de abreviaturas y acrónimos

ADN	Acido desoxirribonucleico
AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ARN	Acido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
BH	Bcl-2 Homology
BOE	Boletín Oficial del Estado
C	Quimiocina $\gamma$
Cad	Caspase-Activated DNase
CC	Quimiocina $\beta$
CEA	Antígeno carcino embrionario
CF1	Carworth farms cepa1
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CSIF	Cytokine synthesis inhibitory factor
CXC	Quimiocina $\alpha$
CX <sub>3</sub> C	Quimiocina $\delta$
DD	Death domain
DISC	Death-inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
EEE	Ecografía endoesofágica
EET	Ecografía endotraqueal
ELR	Acido glutámico-leucina-arginina
ENA-78	Epithelial-cell derived neutrophil-activating protein 78
ENE	Enolasa neuroespecífica
EPA	Erythroid potentiating activity
ET	Ecografía torácica
FADD	Fas-associated death domain
FGF	Fibroblastic Growth Factor
FLICE	FADD-like IL-1- $\beta$ converting enzyme
FLIP	FLICE-inhibitory proteins
FN $\kappa\beta$	Factor nuclear $\kappa\beta$
FT	Factor tisular
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor
GRO $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Growth related oncogen $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
Gro- $\beta$	Growth regulated protein $\beta$

---

HSVtK	Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase
IAPs	Inhibitors of apoptosis proteins
IBGM	Instituto de Biología y Genética Molecular
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMIG	International Mesothelioma Interest Group
INF $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$	Interferon $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$
IP-10	Interferon-inducible protein 10
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
KDa	KiloDaltons
LDH	Lactato deshidrogenasa
mARN	Acido ribonucleico mensajero
MCAF	Monocyte chemotactic and activating factor
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MCP-5	Murine macrophage/monocyte Chemotactic Protein-5
M-CSF	Monocyte Chemotactic Stimulating Factor
MIP-1 $\alpha$ , $\beta$	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , $\beta$
MIP-2	Macrophage Inflammatory Proteins-2
mTNF-R	Membrane Tumor Necrosis Factor-Receptor
NAP-1	Nucleosome Assembly Protein-1
NK	Natural killer
OFI	Oncis France cepa1
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Proteína C reactiva
PET	Tomografía por emisión de positrones
PMN	Polimorfonucleares
QT	Quimioterapia
Raidd	Receptor associated interleukine death domain
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RM	Resonancia magnética
RT	Radioterapia
SCM-1	Single C Motif-1
SCYA	Small inducible cytokine A
SDF-1 $\alpha$ , $\beta$	Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ , $\beta$
SIG	Small inducible gene
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Smac/Diablo	Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct AP-Binding Protein with Low pl
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SRAC	Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora
sTNF-R	Soluble Tumor Necrosis Factor-Receptor
TAC	Tomografía axial computerizada
TGF- $\alpha$ , $\beta$	Transforming Growth Factor $\alpha$ , $\beta$
TIMP-1	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-1

TNF	Tumoral Necrosis Factor
Tradd	TNF receptor associated death domain
Traf	TNF receptor associated factor
TTF-1	Thyroid transcription factor-1
TUNEL	Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
V-FITC	Isotiocianato de fluoresceína
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

## **A.- Planteamiento del Tema**

## 1.- Introducción

En los últimos años, distintos estudios han mostrado que el uso combinado de hipertermia y quimioterapia puede ser de utilidad en el tratamiento de problemas oncológicos complejos como el mesotelioma pleural maligno y las carcinomatosis pleural y peritoneal [1-3]. En el caso del mesotelioma, en los estadios iniciales el tumor afecta exclusivamente a la pleura y la instilación intrapleural de un agente quimioterápico constituiría una forma inmediata de tratamiento adyuvante tras la resección del tumor. En los estadios avanzados, la quimioterapia intrapleural podría suponer también un método terapéutico adecuado.

Utilizando como citostático de elección el cisplatino se ha demostrado que la quimioterapia intrapleural [4] resulta factible y favorable desde el punto de vista farmacocinético pudiendo alcanzarse 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 ampliar la acción del medicamento mejorando la absorción y la eficacia de la droga a nivel intrapleural 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 en su planteamiento al no estar aún sus mecanismos de acción claramente definidos [7].

Adicionalmente, es hoy bien conocido que todas las funciones celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación, la muerte, el mantenimiento de su estado de salud y el desarrollo de enfermedad, son controladas por muchos genes y vías de señalización [8]. En concordancia con este hecho y con el importante papel de las citocinas en los mecanismos de apoptosis, angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular, han sido estudiadas algunas proteínas proinflamatorias para determinar su influencia en la respuesta de las células mesoteliales frente a distintos agentes quimioterápicos [9].

Es cierto que casi todas las funciones celulares son ejecutadas por proteínas, pero éstas no siempre pueden ser tan solo estudiadas por la determinación de la expresión del mRNA. El análisis de distintas experiencias muestra en ocasiones una clara disparidad entre los niveles relativos de mRNA y sus correspondientes proteínas, lo que hace aconsejable el estudio de los niveles de expresión de proteínas para valorar más correctamente su papel funcional [10]. Por otra parte, la detección simultánea de distintas citocinas puede proporcionar una herramienta poderosa para 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 e intentando determinar la modulación y consecuencias de la reacción celular proinflamatoria inducida por los agentes terapéuticos señalados, hipertermia y quimioterapia intrapleural, podría resultar de interés establecer la relación entre el nivel de expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis celular. De este modo, el conocimiento de la dinámica de acción sobre las células pleurales de estos agentes terapéuticos podría ser mejorado.

## **2.- La pleura**

### **2.1.- Concepto**

Según Beltrán de Heredia, “la pleura es una membrana serosa semejante a un saco que recubre de forma continua y sucesivamente las superficies del pulmón y del interior de la caja torácica” [12]. Su principal misión es facilitar el desplazamiento de los pulmones dentro de la cavidad torácica durante las maniobras de inspiración y espiración.

### **2.2.- Descripción anatómica**

Según su localización anatómica se divide en pleura visceral, que tapiza el parénquima pulmonar con sus cisuras y permite separar sus lóbulos, y pleura parietal en la que se diferencian tres partes, una propiamente parietal que recubre el interior de la pared torácica costal, otra que cubre las estructuras mediastínicas y otra que tapiza la parte superior diafragmática.

Ambas pleuras, parietal y visceral, están unidas y se continúan en la reflexión que se produce en el hilio pulmonar, dando lugar a la aparición de un espacio cerrado, casi virtual, de 10 a 20 micras de espesor denominado cavidad pleural, en cuyo interior sólo existe una mínima cantidad de líquido seroso claro de escasa celularidad constituida por monocitos, linfocitos, macrófagos y células mesoteliales, que lubrica las superficies pleurales y permite su deslizamiento. En el humano y en los mamíferos superiores existen dos cavidades pleurales totalmente independizadas entre si.

### **2.3.- Embriología**

La serosa pleural, al igual que el pericardio y el peritoneo, proceden de la capa germinativa mesodérmica. Al final de la tercera semana de gestación el mesodermo intraembrionario se diferencia en porción paraaxil, porción intermedia y lámina lateral. Más tarde, la lámina lateral se divide en dos hojas, una capa que se continúa con el mesodermo extraembrionario que recubre la pared de la cavidad amniótica y que se denomina mesodermo somático o parietal, de donde procede la pleura parietal, y otra capa que se continúa con el mesodermo que tapiza la pared del saco vitelino y que se denomina mesodermo espláncico o visceral, de donde procede la pleura visceral que recubre el parénquima pulmonar. El espacio limitado por estas hojas forma el celoma intraembrionario.

Al continuar el desarrollo, el cuerpo del embrión se curva en dirección cráneo-caudal y se pliega en sentido lateral quedando el celoma intraembrionario convertido en un amplio espacio que se extiende desde la región torácica a la pélvica. La conexión entre las zonas torácica y abdominal del celoma constituyen los canales pleurales (Fig. 1). El desarrollo ulterior del septo transversal, los pliegues pleuropericárdicos (Fig. 2) y pleuroperitoneales y la aparición de las membranas pleuropericárdicas y pleuroperitoneales permite que, hacia la novena semana de vida, el celoma embrionario se divida en diversos compartimentos con la formación de las cavidades pleurales, pericárdica y peritoneal.

Los canales pleurales que contienen los esbozos de origen endodérmico de los futuros pulmones, forman las cavidades pleurales primitivas que están recubiertas por el mesodermo somático o parietal, mientras que los esbozos pulmonares están recubiertos por el mesotelio espláncico o visceral [13] (Fig. 3).

## 2.4.- Citohistología

Las características citohistológicas son similares en ambas pleuras, aunque presentan algunas discretas diferencias. La pleura visceral está constituida por una capa monocelular de células mesoteliales que asienta sobre una delgada membrana basal submesotelial de tejido conjuntivo rica en proteoglicanos [14] bajo la que se encuentra una capa de tejido conectivo fibroelástico, íntimamente unida al parénquima pulmonar, que contiene vasos sanguíneos y linfáticos y que se continúa mediante septos con los tabiques interalveolares pulmonares.

La pleura parietal presenta similares características superficiales, 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 que forman zonas lacunares que se abren directamente, a través de poros o estomas, a la cavidad pleural. Esta capa es más laxa que en la pleura visceral, puede también presentar tejido adiposo y se continúa con el periostio costal y la fascia endotorácica de los que puede ser fácilmente despegable.

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 [15].

Las células mesoteliales tienen una morfología variable tanto en forma como tamaño, desde cúbicas o columnares con núcleos redondeados basales, hasta aplanadas con núcleos elongados. Esta diversa morfología depende de la tensión del tejido fibroelástico subyacente y de la presencia de posibles procesos patológicos.

Con microscopía electrónica se aprecia que estas células disponen de abundantes mitocondrias y de un retículo endoplásmico rugoso con abundantes vacuolas. Se encuentran unidas por desmosomas y se caracterizan por presentar múltiples microvellosidades cortas y de grosor irregular con una función no claramente definida, aunque parece que participan activamente en la absorción del líquido pleural y en la secreción de glicoproteínas y ácido hialurónico. Estas microvellosidades son más abundantes en las células de las zonas basales de la pleura visceral y mediastínica. En ocasiones, estas microvellosidades se ramifican, produciendo la imagen de “célula en medusa”, característica de estas células [16].

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 diversas sustancias quimiotácticas, factores de crecimiento celular, citocinas, etc., que provocan importantes alteraciones, principalmente incremento de la permeabilidad pleural.

La célula mesotelial es capaz de secretar unas sustancias proteicas, del tipo de las citocinas, denominadas quimiocinas de las que se han diferenciado cuatro grupos o subfamilias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , también denominadas respectivamente: CXC, CC, C y CX<sub>3</sub>C [17]. Todas ellas actúan sobre la membrana pleural alterando su funcionalidad e incrementando su permeabilidad. La interleucina 8 (IL-8) es un miembro de las quimiocinas CXC y se encuentra muy elevada en el líquido pleural de los pacientes con derrames paraneumónicos. Esta IL-8 interviene activamente en el desarrollo de la inflamación aguda pleural. En los derrames pleurales tuberculosos se ha comprobado también la existencia de elevadas cantidades de una quimiocina CC denominada MCP-1 [18].

Durante la inflamación, ciertas citocinas inducen en las células mesoteliales la liberación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que es también un potente inductor del incremento de la permeabilidad pleural y permite en los procesos neoplásicos pleurales la diseminación de las células malignas. En los derrames neoplásicos y paraneumónicos se ha comprobado la presencia de este factor en cantidades muy elevadas.

El ácido hialurónico es una proteína formada por cadenas de polisacáridos que es secretada en elevadas cantidades por las células mesoteliales. Esta sustancia es capaz de fijar el receptor CD44 (glicoproteína de la superficie celular), secretado por las células neoplásicas lo que explica la predilección de algunos tumores malignos como los cánceres de pulmón, mama, estómago y ovario por desarrollar metástasis pleurales. Además, presenta alta capacidad angiogénica con la formación de nuevos vasos que facilitan la diseminación neoplásica.

En las células mesoteliales malignas se ha comprobado también la capacidad de producción del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) que también incrementa la angiogénesis y actúa degradando la matriz extracelular facilitando la proliferación y dispersión de las células endoteliales.

La célula mesotelial participa también en la reparación y regeneración de la estructura pleural mediante la síntesis de colágeno y de elastina que permiten la formación de la matriz conjuntiva subyacente. Estas células pueden desprenderse a la cavidad pleural transformándose en macrófagos con intensa actividad fagocitaria.

## 2.5.- Fisiopatología

La función principal de la pleura es facilitar el desplazamiento de los pulmones dentro de la cavidad torácica en las diferentes maniobras de inspiración y espiración. Para desarrollar este movimiento continuado debe existir un equilibrio entre las fuerzas elásticas e inelásticas de la pared torácica y de los pulmones. Este objetivo se consigue ya que cada cavidad pleural es un espacio cerrado, casi virtual, en cuyo interior sólo existe una mínima cantidad de líquido que mantiene adosadas ambas hojas pleurales, parietal y visceral, y permite su desplazamiento evitando la fricción producida por el movimiento continuado respiratorio. La presión dentro de la cavidad pleural es subatmosférica o negativa y oscila entre -5 cm. de H<sub>2</sub>O en la espiración y de -25 a -30 cm. de H<sub>2</sub>O en la inspiración forzada. En bipedestación, esta presión es siempre más negativa en el vértice que en la base de la cavidad pleural.

En normalidad, el volumen de líquido que hay en cada cavidad pleural es muy limitado, de 2 a 5 mililitros. Este líquido seroso es un filtrado del plasma, claro o incoloro, con una celularidad escasa, de 1.000 a 5.000 células por mililitro, constituida por monocitos, linfocitos, macrófagos y células mesoteliales con muy escasos leucocitos.

Sus características físico-químicas son similares a las del plasma, pero con ligeras diferencias. Su concentración proteica es muy inferior a la de la sangre, de 1 a 2 gramos por decilitro, aunque con mayor proporción de albúmina y menor de betaglobulinas. La tasa de glucosa es similar a la del plasma y la cifra de lactato deshidrogenasa (LDH) es inferior a la mitad que la del plasma sanguíneo. El pH es igual o algo más alcalino que el de la sangre debido a una mayor concentración de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> y una menor concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>.

La cantidad de líquido pleural es prácticamente constante ya que existe un equilibrio entre su producción y su reabsorción. En este intercambio líquido están implicados e intervienen cinco compartimentos: la microcirculación sistémica parietal, el intersticio parietal, la cavidad pleural, el intersticio pulmonar y la microcirculación pulmonar. Estos espacios están separados por los endotelios y mesotelios parietales y viscerales que actúan como membranas semipermeables.

Clásicamente se ha considerado que la pleura parietal estaba irrigada por la vascularización sistémica, mientras que la pleura visceral lo estaba por los capilares pulmonares. Debido a esta diferente vascularización y a las diferentes presiones hidrostática y oncótica de estos compartimentos, existía un intenso flujo de líquido pleural, próximo a los 2 litros diarios, que procedente de la pleura parietal era reabsorbido por la pleura visceral.

Actualmente se ha comprobado que tanto la pleura parietal como la visceral presentan una vascularización de tipo sistémico y que mientras la pleura parietal drena su sangre hacia la circulación venosa sistémica y llega a la aurícula derecha, la pleura visceral drena su sangre a la circulación pulmonar y alcanza la aurícula izquierda. El paso de líquido desde los capilares sistémicos de ambas pleuras a la cavidad pleural está regulado por las presiones hidrostática y oncótica de los capilares sistémicos y del líquido pleural, y de la propia presión negativa intrapleural que está modificándose continuamente dependiendo de los movimientos respiratorios [19].

Así, de acuerdo con estos datos, se puede admitir, y actualmente es la teoría más aceptada, que el líquido pleural procede de la circulación sistémica de ambas pleuras, atraviesa las membranas mesoteliales parietal y visceral, alcanza la cavidad pleural y es reabsorbido por los lagos linfáticos de la pleura parietal, que son mucho más abundantes en la parte más declive de la cavidad pleural y en el diafragma.

El acúmulo de líquido o derrame pleural aparece cuando se produce un desequilibrio entre la producción de líquido y su reabsorción y esto ocurre principalmente cuando existe una alteración en el mecanismo de absorción del líquido por parte del sistema linfático.

Otras causas por las que se puede producir un derrame pleural son el aumento de las presiones hidrostáticas de los capilares pulmonares, el descenso de la presión oncótica de la microcirculación, el aumento de la presión negativa intrapleural y el aumento de la permeabilidad en la microcirculación que aparece cuando existe un proceso patológico pleural [20].

## **3.- Neoplasias pleurales**

### **3.1.- Introducción**

Dependiendo de su etiología los tumores pleurales pueden ser primarios o primitivos, procedentes de la propia serosa pleural, y metastáticos o secundarios a procesos tumorales de otras estructuras.

Los tumores pleurales primitivos son raros y poco frecuentes. Debido a su escasa incidencia, su existencia como entidad independiente ha sido ampliamente discutida hasta mediados del pasado siglo, cuando se determinó que eran tumores originados en las células mesoteliales que recubren las serosas y se les comenzó a denominar mesoteliomas.

Los tumores pleurales secundarios son mucho más frecuentes pues la superficie pleural es muy extensa, y en ella pueden desarrollarse metástasis de tumores de otras localizaciones, principalmente de la mama en la mujer y del pulmón en el hombre, aunque también procedentes de tumores de ovario, estómago, páncreas y linfomas.

### **3.2.- Tumores pleurales primitivos**

Pueden ser benignos como los lipomas, de moderada o baja malignidad como los mesoteliomas fibrosos localizados, y malignos como el mesotelioma pleural difuso [21].

### **3.2.1.- Tumores pleurales localizados**

Los lipomas y mesoteliomas fibrosos localizados son realmente tumores de origen submesotelial procedentes de las células del tejido conjuntivo de la capa profunda pleural, por lo que, propiamente, no deben ser considerados como mesoteliomas y se deberían denominar submesoteliomas, fibromas submesoteliales o tumores fibrosos pleurales. Algunos de estos tumores pueden alcanzar gran tamaño e incluso alta malignidad cuando presentan degeneración sarcomatosa.

Los mesoteliomas pleurales auténticos son los tumores que derivan de las células mesoteliales. Se desarrollan en la cavidad pleural y se caracterizan por ser difusos, infiltrar las estructuras adyacentes, presentar un crecimiento rápido, un comportamiento altamente maligno y una elevada mortalidad.

### **3.2.2.- Mesotelioma pleural difuso**

#### **3.2.2.1.- Epidemiología**

Aunque los tumores malignos pleurales difusos fueron descritos por primera vez en el año 1870 por Wagner, fueron Klemperer y Rabin los que, en el año 1931, los denominaron con el término de mesoteliomas [22].

El mesotelioma maligno difuso pleural es un tumor poco frecuente, aunque es el más habitual y característico de los tumores pleurales primitivos. Hasta 1940 su incidencia era prácticamente inexistente [23]. Es en la segunda mitad de ese siglo cuando comienzan a diagnosticarse de forma más precisa.

Actualmente, su incidencia, aun diversa, pues depende del estado de desarrollo e industrialización de los diferentes países, es globalmente muy baja con una tasa inferior a un caso por cada 100.000 habitantes y año [24]. Las mayores incidencias están descritas en la región de Génova, en el oeste de Australia, en Escocia y en la zona de Maastricht, con tasas ajustadas a la población mundial de 5,4; 5,2, 3,4 y 3,3; respectivamente, por cada 100.000 habitantes [25]. En los países no industrializados de Asia y África estas tasas son inferiores a 0,1 casos por 100.000 habitantes.

La alta incidencia en las zonas descritas está en directa relación con la causa etiológica involucrada en el desarrollo del mesotelioma que es la exposición ambiental continuada al asbesto. Debido al amplio uso de este producto durante la segunda mitad del siglo anterior y al prolongado periodo de latencia de la enfermedad, se espera un incremento progresivo de la incidencia de mesotelioma maligno hasta el año 2020 [26]. El mesotelioma es más frecuente en el varón, en una proporción de 5 a 1 [23], y aparece principalmente entre los 50 y los 80 años con una edad media de 65 años.

### **3.2.2.2.- Etiología**

Como se ha indicado anteriormente, el desarrollo de este tumor está íntimamente relacionado con la exposición prolongada y la inhalación de ciertos minerales fibrosos, destacando por su importancia el asbesto. Esta relación fue demostrada por Wagner [27] en el año 1960. Desde entonces se ha comprobado que más del 70% de los pacientes con mesoteliomas refieren contacto prolongado con este producto, bien por manejo directo, bien por exposición ambiental con inhalación de sus fibras [22], y que 5 a 7% de los trabajadores

expuestos al asbesto desarrollan la enfermedad, riesgo que se transmite también a sus convivientes al ser portadores de fibras minerales en su ropa de trabajo [21]. 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.

El asbesto es un mineral fibroso compuesto por haces de fibras de silicatos que se clasifica en dos grupos mineralógicos, las serpentinas representadas por el crisotilo o asbesto blanco (silicato de magnesio) y los anfíboles que incluyen la amosita o asbesto marrón (silicato de hierro y magnesio) y la crocidolita o asbesto azul (silicato de hierro, sodio y magnesio).

Sus efectos patológicos están en relación con la longitud, grosor y composición química de sus fibras. El crisotilo o asbesto blanco está considerado como el de menor riesgo carcinogénico ya que puede fraccionarse en cortas microfibras de reducido grosor que son más fácilmente eliminadas por el aclaramiento pulmonar. La crocidolita y la amosita, debido al mayor tamaño en grosor y longitud de sus fibras, tienen más dificultades para ser eliminadas por las secreciones mucosas broncopulmonares, se depositan en las paredes bronquiales y bronquiolares, pasan a los alveolos y, con el transcurso del tiempo, atraviesan los tabiques interalveolares o son vehiculadas por el sistema linfático, alcanzan la pleura y desarrollan el proceso patológico.

Hay, no obstante, un 20 a 30% de casos de mesoteliomas que aparecen en pacientes que no han tenido nunca contacto con el asbesto, por lo que se han apuntado otros posibles factores etiológicos como las radiaciones ionizantes recibidas tras tratamientos por procesos neoplásicos previos (linfomas de Hodgkin, cáncer de mama, etc.), contacto con fibras de vidrio y otros silicatos (amosita, antofilita, etc.) e, incluso, una posible predisposición genética tras el contacto con un mineral como la erionita, frecuente en la región turca de Capadocia [28].

De forma experimental se ha comprobado que la infección o contacto con el polyomavirus o virus del simio S40 produce en los roedores tumoraciones similares a las del mesotelioma. Además, en un 60% de los mesoteliomas, se han demostrado secuencias de ADN del S40 [29], por lo que se ha considerado que este virus, oncogénico para el hombre, o algún otro virus aún no identificado, podrían tener alguna relación con el desarrollo del mesotelioma pleural en el humano [22,23].

Por último, se ha comprobado que, a diferencia de otros tumores, el consumo de tabaco no está relacionado con la aparición de mesotelioma pleural [22], pero la suma de tabaco y asbesto aumenta en más de un 50% la incidencia y el riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón.

### **3.2.2.3.- Factores biológicos e inmunológicos**

La alteración de las células mesoteliales y el desarrollo del mesotelioma pleural 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 desencadenante 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 que modifican la permeabilidad de la capa pleural y facilitan la diseminación de las células tumorales. Otra sustancia producida por estas células malignas es el FGF o factor de crecimiento de los fibroblastos que aumenta la angiogénesis, proceso invasivo que degrada la matriz extracelular y permite la proliferación y migración de las células neoplásicas.

#### **3.2.2.4.- Histología**

El mesotelioma pleural se presenta macroscópicamente como una lesión tumoral múltiple en forma de nódulos arracimados o placas grisáceas, que afecta a ambas pleuras, más intensamente a la parietal, con predominio en las partes más declives de la cavidad, debido probablemente a factores gravitatorios. Es un tumor que se caracteriza por un predominante desarrollo y crecimiento loco-regional (Fig. 4).

Con microscopía óptica se distinguen tres variedades histológicas: epitelial, fibrosa o sarcomatoide y mixta (con predominio de uno u otro tipo celular) (Fig. 5).

El mesotelioma epitelial es el más frecuente y representa el 50 a 70% del total de los casos. Procede de la capa de células mesoteliales y se caracteriza por estar constituido por células tumorales de aspecto uniforme, de mediano tamaño con patrón papilar o tubular y con pocas anomalías citonucleares. Presenta dificultades para su diagnóstico diferencial con los tumores epiteliales del tipo de los adenocarcinomas que afectan difusamente la pleura como adenocarcinoma de pulmón, cáncer de mama, estómago, ovario, etc., procesos que con frecuencia también ocasionan metástasis pleurales difusas.

La variedad sarcomatoide o fibrosa supone el 10 a 15% de los mesoteliomas pleurales. Procede de los elementos de la capa submesotelial. Se caracteriza por la presencia de células ovales o fusiformes, de aspecto irregular que semejan procesos sarcomatosos con los que se debe realizar el diagnóstico diferencial.

La variedad mixta representa el 20 a 40% de los mesoteliomas. Está constituida por elementos epiteliales y fibrosos con predominio de una u otra estirpe celular. Este patrón bifásico es característico del mesotelioma pleural maligno.

Los hallazgos obtenidos por microscopía óptica son insuficientes para determinar el diagnóstico definitivo de mesotelioma pleural por lo que en la actualidad, para realizar un adecuado diagnóstico diferencial con otros procesos tumorales, se precisan estudios de microscopía electrónica y, principalmente, la utilización de técnicas de inmunohistoquímica mediante el empleo de biomarcadores tumorales del tipo de la vimentina, citoqueratina, antígenos antimesotelio, etc.

### **3.2.2.5.- Sintomatología clínica**

El mesotelioma pleural afecta generalmente a un solo hemitórax siendo en el 60% de los casos de localización derecha debido a su mayor superficie pleural [26]. En un 5% de las ocasiones puede presentar afectación bilateral.

Debido a su largo periodo de latencia y a su lento crecimiento, los síntomas iniciales aparecen cuando el proceso se encuentra en fase avanzada.

Estos síntomas son habitualmente la disnea y el dolor, datos inespecíficos y poco significativos, frecuentes en muy diversos procesos patológicos pleuropulmonares.

La disnea es debida, generalmente, a la frecuente presencia de derrame pleural acompañante. En una primera fase, la disnea puede mejorar tras la evacuación del mismo, pero la progresiva afectación infiltrativa de las pleuras parietal y visceral y su engrosamiento tumoral produce un enclaustramiento pulmonar y una restricción de los movimientos de la pared torácica que incrementan su intensidad. En fases avanzadas se produce la sínfisis de ambas pleuras con una retracción significativa del hemitórax afectado y una seria insuficiencia respiratoria restrictiva.

El dolor es debido a la infiltración tumoral del diafragma y de la pared torácica. Inicialmente es un dolor sordo de localización basal torácica o abdominal alta, frecuentemente irradiado hacia el hombro, debido a infiltración de las fibras del nervio frénico que inervan la parte central del diafragma, zona habitual de inicio del proceso tumoral mesotelial. El dolor torácico es progresivo y está ocasionado por la infiltración de la pleura parietal y la afectación de los nervios intercostales. Este dolor puede llegar a ser de gran intensidad y convertirse en el síntoma más intenso y el más difícilmente manejable.

En fases más avanzadas pueden aparecer otros síntomas relacionados con la infiltración de las estructuras adyacentes: hemoptisis por afectación parenquimatosa pulmonar, taponamiento cardiaco por infiltración pericárdica, disfagia, síndrome de vena cava superior y compresión medular por infiltración de las estructuras mediastínicas, ascitis por infiltración peritoneal, etc.

Se han descrito síndromes paraneoplásicos acompañantes como coagulopatías, anemia hemolítica, tromboembolismo pulmonar, hipercalcemia,

secreción inadecuada de hormona antidiurética, hipoglucemia y osteoartropatía hipertrófica.

El mesotelioma pleural es un tumor con un comportamiento agresivo localizado. La afectación ganglionar loco-regional es muy frecuente y puede aparecer hasta en el 70% de los casos. La diseminación a distancia es menos frecuente y sólo se observa en las fases avanzadas del proceso y, principalmente, en los mesoteliomas sarcomatosos y mixtos. Las metástasis pueden presentar localización pulmonar, ósea, cerebral, hepática, subcutánea, etc. [30]. Aunque clínicamente no sean manifiestas, en estudios necrópsicos se ha podido comprobar la existencia de metástasis hasta en un 70% de las ocasiones.

En fases finales, el paciente presenta un progresivo e importante deterioro y una intensa afectación del estado general con tos irritativa, dolor, astenia y adelgazamiento. Un tercio de los pacientes presentan obstrucción intestinal por infiltración tumoral transdiafragmática. En la mayoría, el fallecimiento suele producirse por un cuadro de insuficiencia respiratoria progresiva o neumonía debidas a la progresión intratorácica del proceso con enclaustramiento del pulmón afectado y compresión del pulmón contralateral. Un 10% fallecen por infiltración tumoral cardiopericárdica [23].

### **3.2.2.6.- Diagnóstico**

#### **3.2.2.6.1.- Métodos de imagen**

En radiología convencional el mesotelioma pleural se manifiesta habitualmente como un derrame pleural. En fases más avanzadas puede apreciarse una pérdida de volumen del hemitórax afectado causada por la infiltración y la retracción de la pleura parietal, con desplazamiento homolateral del mediastino debido al enclaustramiento pulmonar.

Cuando el derrame es limitado, su exacta localización y su densidad se pueden determinar fácilmente mediante ecografía torácica (ET).

En tomografía axial computerizada (TAC) se aprecian imágenes de engrosamiento irregular de la pleura con placas y nodulaciones que dan una imagen de festoneado pleural y se acompañan habitualmente de derrame. La TAC permite también valorar la existencia de adenopatías mediastínicas, la infiltración de la pared torácica y la posible extensión extratorácica del proceso.

La resonancia magnética (RM) es muy útil para delimitar anatómicamente las posibles infiltraciones tumorales extrapleurales y determinar la posibilidad de resección quirúrgica [22].

La realización de una tomografía por emisión de positrones (PET) es aconsejable en estos pacientes para determinar o descartar la presencia de adenopatías mediastínicas afectadas y de metástasis a distancia y efectuar así su adecuada estadificación [31].

Otras técnicas como la ecografía endotraqueal (EET) y la ecografía endoesofágica (EEE) pueden ser de utilidad para determinar posibles infiltraciones de las estructuras mediastínicas, principalmente las vasculares y las cardiopericárdicas.

### **3.2.2.6.2.- Estudio del líquido pleural**

El líquido pleural en los derrames de los mesoteliomas pleurales malignos es un exudado seroso o serohemático que en más de la mitad de los casos se caracteriza por presentar un pH menor de 7,20; una glucosa inferior a 50 mg/dl y una tasa de LDH elevada, superior a 600 UI/ml, muy por encima de las cifras presentes en otros derrames pleurales malignos.

Destaca también la significativa viscosidad de estos derrames, debida a la elevada tasa de ácido hialurónico que, cuando es superior a 100 mg/l en el derrame y se acompaña de tasas bajas de antígeno carcino embrionario (CEA) en sangre y derrame, puede considerarse patognomónico de mesotelioma maligno pleural. El valor del pH se ha utilizado como factor pronóstico en los mesoteliomas epiteliales y cifras superiores a 7,32 se han asociado a mejores tasas de supervivencia [32].

El análisis citológico del líquido muestra células mesoteliales atípicas en un 30% de las ocasiones, pero aunque es útil para demostrar la malignidad del derrame, es insuficiente para su definitivo diagnóstico diferencial con otros procesos malignos, principalmente adenocarcinomas primitivos pulmonares o metastásicos.

### **3.2.2.6.3.- Biopsia pleural**

La biopsia pleural con aguja, bien a ciegas o dirigida por radioscopía, ecografía o TAC [33], puede determinar en casi la mitad de los casos el diagnóstico de proceso maligno pleural, pero debido al reducido tamaño de las muestras, se considera insuficiente para realizar un diagnóstico definitivo de mesotelioma maligno pleural, principalmente epitelial, ya que es difícil diferenciarlo de los adenocarcinomas.

Actualmente, cuando hay cavidad pleural libre y es posible su exploración, la videotoracoscopia es el método diagnóstico más idóneo pues permite la adecuada valoración de la extensión tumoral y la obtención de buenas muestras de tejido tumoral de diferentes zonas pleurales que contribuyen al correcto diagnóstico anatomopatológico mediante la utilización de técnicas de inmunohistoquímica.

En los casos en que se ha producido una sínfisis pleural se debe recurrir a la realización de una minitoracotomía para alcanzar la pleura y lograr la adecuada obtención de biopsias. A pesar de estos métodos, hay aún un porcentaje significativo de pacientes en los que no se logra el diagnóstico ni en la toracotomía exploradora y es la evolución del proceso la que determina finalmente el diagnóstico definitivo.

Las técnicas de inmunohistoquímica mediante el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales del tipo de calretinina, citoqueratina 5, mesotelina, trombomodulina, etc., han supuesto un importante avance en el diagnóstico histológico de los mesoteliomas [34] ya que permiten detectar los distintos tipos de carbohidratos que son capaces de producir las células mesoteliales.

Actualmente el diagnóstico anatomopatológico de mesotelioma pleural se basa en determinar que la biopsia tumoral presenta positividad a un mínimo de dos inmunomarcadores específicos de mesotelioma y negatividad a otros dos inmunomarcadores de otros tumores como el adenocarcinoma.

Los inmunomarcadores D2-40 y calretinina presentan una especificidad para el diagnóstico del mesotelioma epitelial del 95,5%, mientras que CEA y TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1) presentan una especificidad del 100% para el diagnóstico de adenocarcinoma, por lo que, en una biopsia de tumoración pleural, la positividad de los dos primeros y la negatividad de los otros dos puede considerarse concluyente para el diagnóstico de mesotelioma epitelial [35].

El uso de nuevos biomarcadores, todavía en fase experimental, puede facilitar aún más en un futuro inmediato el diagnóstico precoz del mesotelioma [36].

### **3.2.2.7.- Estadificación**

Se han propuesto diversos sistemas de estadificación de los mesoteliomas pleurales, orientados hacia su evaluación pronóstica y su supervivencia. El más clásico utilizado es el de Butchart et al. [37] de 1976, que diferencia cuatro estadios (Tabla I)

Esta clasificación ha sido modificada por distintos autores, principalmente Boutin et al. [38] que subdividen los dos primeros estadios, y Sugarbaker et al. [39] que aplican a su clasificación criterios diagnósticos obtenidos tras los hallazgos toracoscópicos y quirúrgicos.

Actualmente se tiende a utilizar la clasificación propuesta por el International Mesothelioma Interest Group (IMIG) [40], basada en el sistema TNM (Tablas IIa, IIb y IIc), que también se divide en cuatro estadios y permite recoger diversos factores pronósticos obtenidos tras la cirugía (tipo de resección, afectación ganglionar, tipo histológico, etc.) (Tabla III). La aplicación de esta clasificación TNM y su diferenciación en estadios ha permitido comprobar que en los pacientes con mesotelioma pleural maligno, los resultados y la supervivencia son muy diferentes dependiendo de las características clínicas y de la estadificación del proceso.

### **3.2.2.8.- Pronóstico**

El pronóstico del mesotelioma pleural maligno es infausto con una supervivencia media tras el diagnóstico muy limitada que oscila, según las diferentes series, entre los 8 y los 18 meses [41]. Habitualmente y sin tratamiento, menos de un año en la mayoría de los casos [42]. Este pronóstico depende de diferentes factores entre los que destacan el tipo histológico, el estadio de la enfermedad y el estado general del paciente.

Dependiendo del tipo histológico, los mesoteliomas epiteliales son los que presentan mejor pronóstico por su crecimiento más lento y su menor tendencia a presentar metástasis, alcanzando una supervivencia media de 8,5 meses. Los sarcomatoides tienen una supervivencia media de 7 meses y los mixtos de 6 meses [26].

De acuerdo con la clasificación por estadios la supervivencia media del paciente en estadio I es de 16 meses, en el estadio II es de 9 meses, en el estadio III de 5 meses y la supervivencia es mínima en el estadio IV. En diversos

estudios multivariante, las variables clínicas que influyen desfavorablemente en la supervivencia 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 [26].

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 distancia) a los que se les ha podido realizar una resección quirúrgica completa, que alcanzan una supervivencia media de más de 30 meses. Últimamente, el uso de terapias multimodales ha mejorado significativamente estos resultados.

### **3.2.2.9.- Tratamiento convencional**

El tratamiento del mesotelioma pleural maligno ha sido siempre cuestionado debido a la escasa supervivencia y a los malos resultados obtenidos con las distintas actuaciones terapéuticas realizadas. Actualmente, aún no existe un tratamiento de referencia ampliamente aceptado. Hay autores que incluso han propuesto la abstención terapéutica, mientras otros consideran que estos pacientes deben ser remitidos a centros con programas de investigación pues la única alternativa terapéutica es la aplicación de medidas paliativas [23].

Los diversos tratamientos habitualmente realizados se han basado en la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Actualmente se considera que, de acuerdo con la estadificación adecuada del proceso, se deben utilizar terapias multimodales con la inclusión de nuevos tratamientos basados en inmunoterapia, inmunopotenciación genética, utilización de genes suicidas, quimioterapia intrapleural, etc.

### **3.2.2.9.1.- Cirugía**

La cirugía está indicada en el tratamiento de los mesoteliomas pleurales malignos con intención curativa en los estadios iniciales y con criterios de actuación paliativa en los estadios avanzados. Dependiendo de las características del proceso y de la extensión tumoral, se pueden realizar pleurectomía y pleuroneumonectomía (Fig. 6).

#### **3.2.2.9.1.1.- Pleurectomía**

La pleurectomía o decorticación consiste en la eliminación de la pleura afectada. Su objetivo, además de la eliminación del tumor, es evitar la aparición de derrames pleurales recidivantes. Aunque la eliminación de la pleura parietal costal no presenta muchas dificultades, la exéresis de la pleura visceral resulta más dificultosa pues se encuentra íntimamente adherida al parénquima pulmonar y su eliminación puede provocar hemorragias, fístulas broncopleurales y fuga aérea persistente con neumotórax y posible enfisema subcutáneo.

#### **3.2.2.9.1.2.- Pleuroneumonectomía**

La pleuroneumonectomía o neumonectomía extrapleural consiste en la resección en bloque del pulmón y de todo el saco pleural, extendida a los trayectos de los trócares de las exploraciones previas [24], a las adenopatías mediastínicas, al pericardio y al diafragma (Fig. 7). Se debe realizar la reconstrucción de estas dos últimas estructuras mediante su sustitución por materiales protésicos a base de poliésteres y polietilenos (Dacron®, Goretex®), para mantener la integridad de las cavidades torácica, pericárdica y peritoneal.

El paciente debe presentar buen estado general y unas pruebas funcionales respiratorias y cardíacas que permitan la neumonectomía. La mortalidad postoperatoria se encuentra entre el 5 y el 10% dependiendo de la experiencia de los diferentes centros [43]. La morbilidad es elevada, cerca del 61% [44], y consiste en fístulas broncopleurales, trastornos del ritmo cardíaco, empiema, insuficiencia respiratoria, etc.

La pleuroneumectomía como tratamiento exclusivo presenta una supervivencia media a los dos años que oscila entre el 10 y el 30%, según las series [22]. Esta cifra disminuye drásticamente cuando existe afectación tumoral de las adenopatías mediastínicas [45], con menor tasa de supervivencia en los N2 que en los N1 [46].

Este hecho justifica que en todos estos pacientes esté indicado realizar una valoración mediastínica previa a la intervención quirúrgica. La mediastinoscopia o la mediastinotomía permiten explorar los diferentes territorios ganglionares y descartar la infiltración tumoral de las adenopatías lo que constituye una clara contraindicación para la pleuroneumectomía. No obstante, en la mitad de los casos se pueden encontrar durante la intervención quirúrgica adenopatías positivas que no han podido ser detectadas en la exploración mediastínica realizada previamente [47].

Aunque la cirugía se ha propuesto como el tratamiento de elección en el mesotelioma, la resección quirúrgica no permite el adecuado control microscópico de la enfermedad, por lo que, utilizada de forma aislada, se acompaña de una elevada tasa de recidivas.

### **3.2.2.9.1.3.- Cirugía paliativa**

Aplicada con intención paliativa la cirugía puede actuar en el tratamiento de los derrames, principalmente los recidivantes, mediante la evacuación con drenaje pleural y la realización de una pleurodesis, bien con métodos físicos (abrasión pleural), como mediante diversos productos irritantes (bleomicina, tetraciclina), aunque la instilación intrapleural de talco micronizado, controlada por videotoracoscopia, es la que ha aportado los mejores resultados.

En los derrames pleurales recidivantes que no ceden con pleurodesis repetidas se puede mejorar la calidad de vida de los pacientes mediante la colocación de un drenaje pleuroperitoneal con válvula unidireccional [48].

### **3.2.2.9.2.- Radioterapia**

El mesotelioma pleural maligno es un tumor radiosensible, pero la aplicación aislada de radioterapia (RT), aunque reduce la masa tumoral, no ha permitido mejorar la supervivencia. La RT aplicada como tratamiento único con intención curativa precisa de altas dosis de radiación ya que el volumen del campo a tratar, todo el hemitórax afectado, es muy elevado, por lo que su aplicación está limitada debido a los daños que puede provocar sobre las estructuras mediastínicas subyacentes.

En el tratamiento del dolor parietal, la RT ha demostrado su utilidad como terapia paliativa, con buena respuesta, aunque sólo temporal, en más del 60% de los casos [49]. También está indicada su aplicación a dosis de 20 Gy en la zona de los trayectos de los trócares de las exploraciones previas, para evitar la progresión tumoral local de la enfermedad.

Se ha propuesto la radiación profiláctica de la pared torácica antes de realizar toracotomía para reducir la incidencia de recidivas parietales, pero la dosis y el tiempo de aplicación no están aún claramente definidos [49]. La RT aplicada a dosis de 54 Gy tras la pleuroneumonectomía reduce la tasa de recidivas locales hasta menos de un 4%, pero no impide que cerca de la mitad de los pacientes desarrollen metástasis a distancia [50].

Las nuevas técnicas de altas dosis de irradiación con modulación de la intensidad y la combinación de electrones y fotones aportan una mejor tolerancia [51], aunque no están exentas de fatales complicaciones [52]. También se ha propuesto la aplicación de isótopos radiactivos intrapleurales, principalmente Au 198, pero los resultados son desalentadores.

Excepto en el tratamiento con carácter paliativo del dolor parietal, en la actualidad la RT está desestimada como terapéutica única y su aplicación sólo se contempla en el entorno de tratamientos multimodales junto con la cirugía y la poliquimioterapia [53].

### **3.2.2.9.3.- Quimioterapia**

Se han utilizado múltiples citostáticos en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno, aunque ninguno *per se* ha mostrado una significativa mejoría de la supervivencia. Se han aplicado pautas de monoterapia utilizando diversos medicamentos, etopósido, 5-fluoruracilo, carboplatino, cisplatino, doxorubicina, ifosfamida, pero la tasa de respuesta siempre ha sido inferior al 15%.

La poliquimioterapia con el uso de dos agentes ha mejorado discretamente los resultados con tasas de respuesta del 20 al 25% según las diferentes series. El uso de doxorubicina y cisplatino aporta una tasa de

respuesta cercana al 30%, que asciende hasta el 44% si se les añade bleomicina y mitomicina. La aplicación de carboplatino y gemcitabina presenta buenos resultados con mejoría significativa de la sintomatología clínica, disminución de la disnea, aumento de peso y disminución del dolor, una supervivencia media de 66 meses y una supervivencia a los dos años del 30% [54].

En pacientes irresecables, pautas de poliquimioterapia con cisplatino y gemcitabina seguidas de mitoxantrone, metotrexate y mitomicina aportan una supervivencia media de 13 meses con una supervivencia al año del 63% [55].

Los resultados con los nuevos antifolatos como el pemetrexed y el raltitrexed solos o en combinación con cisplatino [56], aunque son modestos, resultan muy esperanzadores [57], pero aún no han mostrado una determinante mejoría en la supervivencia ni en la calidad de vida de estos pacientes si se compara con la pleurodesis con talco [58].

A pesar de ello, la supervivencia siempre es mayor en los pacientes sometidos a quimioterapia que en los que sólo se aplican cuidados paliativos (12 meses frente a 4 meses) [59]. Las nuevas guías de práctica clínica aconsejan la aplicación suplementaria de vitamina B12 y ácido fólico a los pacientes tratados con pemetrexed, raltitrexed y cisplatino para mejorar sus resultados [60].

### **3.2.2.10.- Nuevos tratamientos**

El tratamiento de los mesoteliomas está en continua evolución y los avances en la investigación han permitido que últimamente se hayan propuesto y desarrollado nuevas pautas terapéuticas que se van incluyendo lenta, pero

progresivamente en el tratamiento de estos pacientes logrando mejores resultados y aumento discreto de su supervivencia.

### **3.2.2.10.1.- Tratamientos multimodales**

En los últimos años se han propuesto diversas combinaciones terapéuticas utilizando diferentes pautas de quimioterápicos con variados protocolos de radioterapia, pero la mayoría de las actuaciones no han permitido mejorar de forma significativa la supervivencia de estos pacientes. La cirugía de exéresis, con resección macroscópica completa o tan sólo citorreductora, junto con diversas pautas de quimioterapia adyuvante han permitido una discreta mejoría en los resultados [61].

La pauta terapéutica óptima está aún por descubrir, aunque, últimamente, algunas propuestas han aportado resultados esperanzadores dentro del mal pronóstico que este proceso presenta.

Tras la propuesta inicial de Sugarbaker et al. [39] de aplicar en 183 pacientes seleccionados una terapia trimodal consistente en cirugía radical con pleuroneumectomía seguida de quimioterapia adyuvante con doxorubicina y ciclofosfamida y radioterapia sobre el hemitórax intervenido, se han ido modificando los agentes quimioterápicos (incluyendo cisplatino y más tarde carboplatino y paclitaxel), sus dosis y sus ciclos, al igual que las dosis de radioterapia y las pautas de aplicación. Los resultados han mejorado progresivamente con incremento de la supervivencia que llega a ser del 38% a los 2 años y del 15% a los 5 años en el total de la serie y alcanza hasta el 68% a los 2 años y el 46% a los 5 años en un grupo seleccionado de 31 pacientes en estadio I con mesotelioma de estirpe epitelial, resección completa de la lesión

con márgenes libres de infiltración y ausencia de afectación de las adenopatías mediastínicas.

En las últimas publicaciones destaca la mejoría de los resultados aplicando quimioterapia de inducción o neoadyuvante [62], aunque con una elevada tasa de complicaciones postquirúrgicas que en algunas series alcanzan el 62% [63], destacando principalmente la fístula broncopleural, el empiema, la dehiscencia de la plastia diafragmática y el quilotórax [64].

La aplicación de un tratamiento trimodal basado en quimioterapia de inducción con tres o cuatro ciclos de carboplatino y gemcitabina seguido a las 3 a 5 semanas de cirugía con pleuroneumectomía y radioterapia adyuvante del hemitórax intervenido a las 4 a 6 semanas de la cirugía, presenta una supervivencia media de 25,5 meses con una supervivencia al año, a los 3 años y a los 5 años de 71%, 33% y 19% respectivamente [65]. La aplicación de estas terapias, incluyendo irradiación a altas dosis, en los estadios avanzados, alcanza una supervivencia superior a los 33 meses [66].

Esta terapia trimodal es la que se está imponiendo paulatinamente en el tratamiento de los pacientes con mesotelioma pleural maligno y la que está aportando en el momento actual los mejores resultados, principalmente en los que se encuentran en estadios iniciales.

### **3.2.2.10.2.- Inmunoterapia**

La exposición prolongada al asbesto de las células mesoteliales y la eliminación por parte de las células tumorales mesoteliales de productos que disminuyen la inmunidad y aumentan el crecimiento tumoral justifican la

utilización de ciertas sustancias capaces de potenciar la inmunidad tanto celular como humoral.

La interleucina 2 (IL-2) y el interferón gamma (INF  $\gamma$ ) por vía intrapleural presentan actividad antiproliferativa y potencian la actuación antitumoral de los macrófagos [24]. El interferón alfa (INF  $\alpha$ ) por vía subcutánea presenta una respuesta del 16%, pero con mala tolerancia por parte de los pacientes.

En los últimos estudios, la aplicación en los estadios II y III de terapias multimodales basadas en IL-2 intrapleural preoperatoria seguida de cirugía con pleurectomía o decorticación, epidoxorubicina intrapleural postoperatoria, radioterapia, quimioterapia sistémica con cisplatino y gemcitabina e inmunoterapia prolongada con IL-2 subcutánea, aporta una supervivencia media de 26 meses, (31 meses en los pacientes en estadio II y 21 meses en los pacientes en estadio III) [67].

### **3.2.2.10.3.- Terapia génica**

La terapia génica en oncología se basa en la posibilidad de modificar las características genéticas de las células y aprovechar estas modificaciones con fines terapéuticos. Estas modificaciones tienen diversos objetivos: aumentar la actividad antitumoral de las células del sistema inmunológico, incrementar la inmunogenicidad de las células tumorales, potenciar la destrucción de estas células, impedir el efecto angiogénico inducido por los propios tumores, estimular los antioncogenes o genes supresores de tumores, etc.

Los mecanismos para lograrlo se basan en la transferencia de genes modificados o cadenas de material genético en el interior de las células que deseamos destruir. Esta transferencia génica se realiza mediante diferentes

vectores o medios vehiculadores. Los más utilizados por su eficacia son los vectores virales que son capaces de alcanzar un número muy elevado de “células diana”. Los virus más utilizados son los adenovirus, los retrovirus y el virus del herpes simple. Otro mecanismo es el marcaje celular que consiste en vehicular de forma conjunta el gen terapéutico junto con otro gen capaz de identificar la “célula diana”.

En el caso del mesotelioma pleural maligno el objetivo es actuar sobre las células mesoteliales tumorales para provocar su destrucción. Es un campo de actuación muy atractivo ya que la cavidad pleural es fácilmente accesible, presenta una superficie muy amplia sobre la que poder actuar y permite la utilización de altas concentraciones del producto ya que su repercusión sistémica es mucho menor que aplicado por vía intravenosa [68].

La mayoría de las actuaciones en este campo se encuentran aún en fase experimental y consisten en la aplicación de diversos virus oncolíticos en cultivos celulares [69].

En pacientes con mesotelioma se han iniciado diversos estudios utilizando diferentes métodos. La mayoría se basan en la utilización de un “gen suicida”, generalmente un virus modificado genéticamente. Se aplica por vía intrapleural y, utilizando como vector un adenovirus, se transfiere al paciente el gen que codifica la timidin quinasa del virus del herpes (HSVtK). Esto provoca que la célula del mesotelioma maligno a la que se ha transferido el gen sea sensible a un antiviral como el ganciclovir. La aplicación de este medicamento produce la destrucción celular [70].

Otro mecanismo es transmitir genes que codifican citocinas u otros inmunomoduladores. Para ello se utiliza como vector el virus de la vacuna y se introduce como agente el gen de la IL-2 que se replica dentro de las células tumorales y produce su destrucción.

Actualmente en los diversos estudios que se están realizando, el mecanismo más frecuentemente usado como vector es el adenovirus. Respecto a la naturaleza de los genes transferidos se distinguen cinco categorías: genes que sensibilizan a la célula o “genes suicidas” como HSVtK; citocinas y otros agentes inmunomoduladores como la IL-2; genes supresores de los tumores como el p53; proteínas inhibidoras de la angiogénesis y antígenos tumorales [71].

En pacientes con mesotelioma que presentan respuesta incompleta tras someterles a radioterapia, se ha comprobado que la terapia génica viral mediante virus oncolíticos facilita la destrucción de las células tumorales que tienen dañado el ADN por los efectos de la irradiación [72]. A pesar de los diversos estudios las series son aún muy escasas y los resultados son poco significativos.

#### **3.2.2.10.4. - Terapia fotodinámica**

Se ha utilizado principalmente como complemento de la cirugía de exéresis. Consiste en la administración preoperatoria por vía intravenosa de una sustancia fotosensibilizadora, generalmente un derivado de las hematoporfirinas, que alcanza las células tumorales. Tras la intervención quirúrgica, la aplicación de una luz de determinada longitud de onda, que depende de la sustancia utilizada, estimula la producción de radicales libres de oxígeno y otros productos citotóxicos que provocan la destrucción celular. Sus resultados han sido poco esperanzadores pues no aumenta la supervivencia e incrementa las complicaciones postoperatorias.

### **3.2.2.10.5.- Terapia trimodal con QT hipertérmica intrapleural**

El tratamiento del mesotelioma ha presentado un nuevo avance en los últimos años al añadir a la terapia trimodal, que tan excelentes resultados estaba mostrando, la aplicación en la cavidad pleural, durante el acto operatorio y tras la cirugía de exéresis, de quimioterápicos, principalmente adriamicina y cisplatino, en perfusión continua a temperatura normal o en perfusión hipertérmica. Este nuevo método terapéutico ha abierto nuevas y esperanzadoras vías al tratamiento del mesotelioma pleural maligno [73,74].

La aplicación local del quimioterápico en perfusión hipertérmica en la cavidad pleural 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.

## **3.3.- Tumores pleurales secundarios**

Los tumores pleurales secundarios o metastásicos son mucho más frecuentes que los tumores pleurales primitivos. Su mayor incidencia se debe a que la pleura presenta una gran superficie y es muy fácil que en ella se desarrollen metástasis de tumores de otras estructuras. Estos procesos secundarios provocan más del 40% de todos los derrames pleurales, sólo superados por los derrames paraneumónicos o infecciosos.

### **3.3.1.- Etiología**

Los procesos neoplásicos que más frecuentemente presentan diseminación metastásica en la pleura son el cáncer de pulmón (35 a 45% de los casos), el cáncer de mama (25 a 30%), los linfomas (10 a 15%), el cáncer de ovario (3 a 5%) y el cáncer gástrico (3%).

Otros tumores que pueden ocasionar metástasis pleurales, aunque con una frecuencia menor (aproximadamente del 1% cada uno) son los tumores malignos del timo y los cánceres de colon, páncreas, útero y vejiga. En el 6 a 10% de los casos no se logra determinar el origen del tumor maligno primitivo.

### **3.3.2.- Patogenia**

El mecanismo más frecuente de producción de metástasis pleurales se debe a la implantación de émbolos tumorales que, dependiendo de los diferentes tumores primarios, pueden alcanzar las superficies pleurales por vía hemática, por vía linfática o por contigüidad.

Esta afectación tumoral de las estructuras vasculares submesoteliales produce una serie de reacciones de tipo inflamatorio en las células mesoteliales con secreción de diversas sustancias vasoactivas y factores de crecimiento tumoral que ocasionan hiperplasia mesotelial con engrosamiento pleural y descamación de células malignas a la cavidad pleural. Este engrosamiento pleural evoluciona hacia una progresiva fibrosis con bloqueo vascular y linfático, paulatino crecimiento celular tumoral, destrucción de la matriz conjuntiva, infiltración de la serosa pleural y alteración de su permeabilidad.

En fases más avanzadas el bloqueo linfático impide la normal reabsorción del líquido pleural y su acúmulo en la cavidad ocasionando la aparición del derrame pleural.

### **3.3.3.- Sintomatología**

Los tumores pleurales metastásicos pueden cursar con tos, dolor torácico, disnea, afectación del estado general, etc., pero la manifestación más frecuente y, a veces, el primer síntoma demostrable de la enfermedad, es el derrame pleural.

## **3.4.- Derrame pleural maligno**

### **3.4.1.- Concepto**

Es la ocupación de la cavidad pleural por un líquido, habitualmente un exudado, en el que mediante estudios citohistológicos se puede demostrar la existencia de células neoplásicas malignas.

### **3.4.2.- Etiología**

Cualquier proceso tumoral de cualquier órgano puede ser la causa de la aparición de un derrame pleural maligno, aunque los más frecuentes, aproximadamente el 75%, proceden de neoplasias broncopulmonares y mamarias y de procesos linfoproliferativos. En el varón, más de la mitad de estos derrames se deben a un cáncer de pulmón y cerca del 20% a un proceso linfoproliferativo. En la mujer, cerca del 40% de los derrames pleurales malignos son consecuencia de un cáncer de mama y casi el 20% proceden de tumores genitales. Cerca del 6% de los derrames, en ambos sexos, se deben a procesos tumorales gastrointestinales. En casi un 10% de las ocasiones no se llega a determinar el origen del tumor primitivo.

La mayoría de los tumores que pueden ocasionar metástasis pleurales, como se han reseñado anteriormente, pueden también provocar la aparición de un derrame pleural maligno.

### **3.4.3.- Patogenia**

El acúmulo de líquido en la cavidad pleural se debe a las alteraciones que el propio proceso neoplásico provoca sobre la serosa pleural y que se caracterizan globalmente por una mayor permeabilidad y una pérdida de la capacidad de reabsorción.

Los mecanismos por los que se produce el derrame pleural en estos procesos son diversos. Hay un mecanismo directo en relación con la propia afectación neoplásica de la pleura que se caracteriza por la producción de diferentes sustancias que provocan un proceso inflamatorio pleural y un

incremento de su permeabilidad. Además, esta afectación tumoral, principalmente de la pleura parietal, se acompaña de la obstrucción de los vasos y lagos linfáticos lo que provoca una pérdida significativa en la capacidad de reabsorción del líquido pleural. La afectación de las estructuras adyacentes puede provocar la obstrucción de los vasos venosos, de los ganglios linfáticos mediastínicos y del conducto torácico que conlleva una disminución aún mayor de la capacidad pleural de evacuación del líquido acumulado.

En los procesos linfoproliferativos la aparición del derrame se debe principalmente al bloqueo de los ganglios linfáticos mediastínicos y a la obstrucción del conducto torácico. En todos estos casos la presencia de células malignas en el líquido pleural es muy frecuente.

En ocasiones, estos derrames no se deben a la presencia de metástasis por actuación directa del tumor sobre la pleura, y su origen está en las repercusiones sistémicas del mismo, en sus efectos loco-regionales y en las consecuencias derivadas de la aplicación de algunas terapias antitumorales como la radioterapia.

Así, algunos de estos derrames pueden estar en relación con la hipoproteinemia, habitual en enfermos neoplásicos, con la posible aparición de tromboembolismos pulmonares y con la presencia de neumonías obstructivas acompañadas de atelectasias que provocan un incremento de la presión negativa de la cavidad pleural y mayor acúmulo de líquido pleural.

En algunas de estas ocasiones es posible que no se pueda determinar la presencia de células malignas en el líquido pleural por lo que estos derrames se pueden denominar “paramalignos”.

### **3.4.4.- Sintomatología**

Habitualmente los derrames pleurales malignos son de escasa o moderada cuantía oscilando entre los 500 y 1.000 ml. Así, la cuarta parte de los pacientes con derrame maligno pleural no presentan ninguna sintomatología. En muchas ocasiones, los únicos síntomas presentes son ocasionados por el tumor primitivo y el estudio del proceso permite descubrir la existencia del derrame pleural. Los de mínima o moderada intensidad pueden pasar desapercibidos por no presentar ninguna sintomatología o bien cursar paucisintomáticos. Sólo cuando la ocupación líquida pleural es manifiesta el paciente comienza a notar dificultad respiratoria.

Así, el síntoma más frecuente e importante de los derrames pleurales malignos es la disnea que afecta habitualmente a más de la mitad de los enfermos. Esta dificultad respiratoria será más o menos intensa dependiendo de la cuantía del derrame. En ocasiones, cuando coexiste también patología pulmonar, la disnea puede estar presente incluso en derrames de pequeña cantidad.

Otro síntoma importante es el dolor. Se debe a la infiltración tumoral de la pleura parietal y de las estructuras adyacentes y está presente en más del 25% de los enfermos. Es un dolor sordo, de localización imprecisa, pero generalmente referido a la parte inferior del tórax, que se incrementa con los movimientos respiratorios. Cuando existe afectación de la pleura diafragmática el dolor está irradiado al hombro del lado afectado, debido a la inervación por parte del nervio frénico de esa estructura.

Otros síntomas presentes en los pacientes con derrames pleurales malignos son la tos seca, irritativa, y la afectación del estado general con astenia, anorexia y adelgazamiento, etc.

Una característica significativa de los derrames pleurales malignos es que recidivan frecuente y rápidamente tras su evacuación.

### **3.4.5.- Diagnóstico**

La certeza diagnóstica se basa en la demostración de la existencia de un proceso maligno que cursa con la ocupación líquida de la cavidad pleural. El diagnóstico se consigue determinando la presencia de células malignas en el derrame pleural o bien la existencia de tejido tumoral en las biopsias realizadas en la pleura. El primer paso consiste en demostrar la existencia de un derrame pleural. Para lograr este objetivo se pueden utilizar diferentes métodos diagnósticos.

#### **3.4.5.1.- Métodos de imagen**

Las técnicas descritas anteriormente en el diagnóstico del mesotelioma pleural son aplicables al estudio de los derrames pleurales malignos. Algunas como la radiografía convencional o la TAC son fundamentales para su diagnóstico. En la radiografía simple de tórax se aprecia una ocupación líquida de la cavidad pleural que puede ser casi imperceptible, con un simple pinzamiento del seno costofrénico, en los derrames mínimos, o completa, con

opacificación del hemitórax afectado e incluso desplazamiento mediastínico contralateral en los masivos. A veces, en los derrames subpulmonares derechos, el proceso puede pasar desapercibido y sólo la realización de una radiografía en decúbito lateral permite evidenciar la presencia de líquido libre en la cavidad pleural.

El derrame debido a un carcinoma broncopulmonar suele ser del mismo lado que el tumor primitivo y en la radiografía se pueden apreciar, en ocasiones, manifestaciones radiológicas propias del tumor. Este derrame cursa habitualmente sin desplazamiento mediastínico contralateral debido a la retracción homolateral provocada por la propia tumoración. Los carcinomas de mama suelen también desarrollar los derrames en el mismo lado del tumor. Con frecuencia, y en la mayoría de los tumores, en la radiografía de tórax se aprecia que el derrame pleural es bilateral.

La TAC es muy útil para el diagnóstico pues permite descubrir derrames de escasa cuantía. Además de determinar su exacta localización y su magnitud permite también, en la mayoría de las ocasiones, identificar el tumor primitivo, la existencia de posibles tumoraciones pleurales, la presencia de adenopatías y la infiltración de las estructuras adyacentes.

La ecografía torácica es un método sencillo, rápido y económico para poder determinar la localización exacta de los derrames pleurales y el más utilizado para elegir la zona donde realizar la toracocentesis o la colocación de un drenaje torácico en los de escasa cuantía, los multiloculados, los encapsulados o los de difícil localización.

Se pueden utilizar también otros métodos diagnósticos: RM, PET, EET, EEE, como se ha reseñado en el diagnóstico de los mesoteliomas pleurales malignos, pero los datos que aportan son escasos respecto a los obtenidos por

la radiología convencional, la TAC y la ecografía y además, su coste es mucho mayor.

### **3.4.5.2.- Toracocentesis**

Tras la demostración mediante los métodos de imagen de la existencia de un derrame pleural, la siguiente actuación diagnóstica para su estudio es la obtención de líquido de la cavidad pleural. El método más sencillo y elemental para conseguirlo es la toracocentesis o punción con aguja que debe realizarse bajo control radiológico o ecográfico en los derrames de escasa cuantía o cuando están encapsulados.

Cuando el derrame es cuantioso y ocupa la mayor parte de la cavidad pleural, la punción puede realizarse en el plano lateral del tórax, entre las líneas axilares anterior y posterior y a la altura del 5º ó 6º espacio intercostal, zona donde existen menos planos musculares, el grosor de la pared torácica es menor, el acceso al derrame es más fácil y disminuye el riesgo de posibles complicaciones.

Esta punción para la obtención de una muestra del líquido pleural puede también ser utilizada, en el mismo acto, como método terapéutico permitiendo la evacuación parcial del derrame. El líquido obtenido, además de para estudio citológico, debe ser también procesado para estudio bioquímico y microbiológico.

En los pacientes que presentan un engrosamiento pleural, es conveniente realizar también en el mismo acto una punción biopsia transparietal a ciegas mediante aguja cortante lo que permite, en múltiples ocasiones, la obtención de fragmentos de la pleura parietal útiles para el diagnóstico histológico del proceso. Cuando la pleura presenta aspecto radiológico normal,

la rentabilidad diagnóstica de esta punción biopsia es muy limitada, inferior al estudio citológico del líquido pleural.

### **3.4.5.3.- Estudio del líquido pleural**

Los derrames pleurales malignos se presentan habitualmente como exudados de aspecto seroso, serohemático o claramente hemorrágico. Los debidos a procesos linfoproliferativos se manifiestan generalmente como un quilotórax. Globalmente se caracterizan por presentar una tasa de glucosa baja, menor de 60 mg/dl, una LDH elevada y un pH inferior a 7,30.

En los quilotórax la tasa de triglicéridos suele ser superior a 100 mg/dl. La presencia de una cifra elevada de CEA suele estar en relación con procesos malignos de tipo adenocarcinoma, bien de origen pulmonar o como metástasis de cualquier otro órgano. La enolasa neuroespecífica (ENE) puede estar elevada en los derrames pleurales debidos a neoplasias pulmonares de célula pequeña.

El uso de marcadores tumorales aún no ha aportado datos definitivos en el estudio de estos derrames.

El estudio citológico del líquido pleural y la demostración de células neoplásicas malignas son determinantes para el diagnóstico de derrame maligno pleural. Esto se consigue globalmente en más de la mitad de las citologías realizadas tras toracocentesis, aumentando la rentabilidad diagnóstica hasta cerca del 75% en los adenocarcinomas metastásicos y cuando también se realiza biopsia pleural a ciegas.

El diagnóstico citológico es más fácil en los derrames pleurales secundarios a los carcinomas de mama y ovario ya que son procesos tumorales que presentan una mayor descamación celular. Esta rentabilidad diagnóstica es

menor, aproximadamente del 30%, en los derrames debidos a neoplasias broncopulmonares epidermoides e inferior al 25% en los derrames debidos a enfermedad de Hodgkin.

La utilización de técnicas de citoimmunohistoquímica y el estudio con microscopía óptica y electrónica del bloque celular obtenido tras la centrifugación del líquido pleural, permiten la diferenciación diagnóstica de la mayoría de estos derrames. La citometría de flujo ha demostrado su utilidad, principalmente en el diagnóstico de los derrames pleurales malignos secundarios a procesos linfoproliferativos al poder determinar la presencia de una proliferación celular clonal en el líquido pleural.

A pesar de todas estas pruebas realizadas hay aproximadamente un tercio de pacientes en los que no se logra el diagnóstico definitivo, aunque se sospeche la malignidad del derrame. En estos casos es necesario el empleo de otros métodos diagnósticos basados en la exploración de la cavidad pleural y la toma de muestras de biopsia pleurales.

#### **3.4.5.4.- Toracosopia y videotoracosopia**

Es el método más efectivo para el diagnóstico de los derrames pleurales malignos ya que permite la visualización y la adecuada exploración de la cavidad pleural, la identificación de las lesiones pleurales: engrosamientos, nodulaciones, tumoraciones, etc., su localización, su extensión y la toma dirigida de biopsias de todas las zonas sospechosas.

El estudio histológico de estas biopsias mediante la utilización de técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica, el uso de marcadores específicos y la determinación de receptores de estrógenos y de progesterona

[75], permiten, en este momento, diagnosticar etiológicamente la práctica totalidad de los derrames pleurales malignos.

En la actualidad se puede considerar que el método más efectivo para lograr el diagnóstico en los derrames pleurales neoplásicos es la realización de una videotoroscopia y la toma dirigida por visión directa de múltiples biopsias pleurales. No obstante, en algunas ocasiones, cuando la cavidad pleural está multitableada, presenta abundantes adherencias o el enfermo no tolera el colapso pulmonar necesario para realizar la toroscopia, se debe practicar una minitoracotomía para poder obtener adecuadas muestras de biopsia.

### **3.4.6.- Pronóstico**

La presencia de un derrame pleural maligno es característica de un proceso neoplásico extendido y en esta situación el pronóstico de los pacientes es muy desfavorable. La supervivencia va a depender del tumor primitivo, de sus características histológicas y de su respuesta a las diferentes terapéuticas.

Se ha comprobado que el pronóstico es peor y la supervivencia más baja en los derrames que presentan una tasa de LDH elevada, una cifra de glucosa inferior a 60 mg/dl y un pH menor de 7,30. Estos datos están en relación con el tamaño de la masa tumoral pleural que provoca un importante componente inflamatorio y la limitada llegada de glucosa a las células.

En conjunto, se describen supervivencias muy escasas, próximas a los 4 a 6 meses, habitualmente inferiores al año, en la mayoría de los pacientes. En los derrames debidos a cáncer de pulmón la supervivencia es inferior a los 6 meses. En los secundarios a cáncer de mama esta supervivencia es mayor

alcanzando un 20% a los 3 años. Sin duda el pronóstico está en relación con la respuesta al tratamiento oncológico radioquimioterápico del tumor primario.

### **3.4.7.- Tratamiento**

Independientemente de la posible actuación terapéutica sobre el tumor primitivo, el tratamiento principal de estos pacientes con derrame pleural neoplásico, debe estar encaminado a mejorar su calidad de vida y se basa principalmente en aliviar la sintomatología ocasionada por el derrame, principalmente la disnea, el dolor y la tos.

Las distintas actuaciones terapéuticas deben estar en relación con el tipo de tumor primitivo, la presencia de extensión tumoral en otras estructuras además de la pleura, su posibilidad de respuesta al tratamiento oncológico, la supervivencia estimada y el estado general del paciente.

Se ha considerado que la escala de Karnofsky puede ser utilizada como criterio predictivo de supervivencia y que sólo estaría indicado realizar algunas actuaciones como la pleurodesis en pacientes con un índice superior a 70% [76].

No obstante, e independientemente del tratamiento sintomático para el dolor y la tos, en todos los casos se debe actuar intentando evacuar el derrame y provocando una pleurodesis o sínfisis pleural para evitar su recidiva. Así, dependiendo del estado general, se puede optar por actuaciones sencillas, poco agresivas y que no requieren hospitalización, como las toracocentesis evacuadoras repetidas, que alivian la disnea y están indicadas principalmente en pacientes con mal estado general y muy limitada supervivencia. Tienen el inconveniente de que las punciones múltiples puede producir una contaminación

bacteriana del derrame, provocando un empiema pleural con mayor agravamiento del estado general.

La colocación de un drenaje torácico es una actuación poco agresiva y permite la evacuación completa del derrame y la posibilidad de realizar un intento de pleurodesis química, incluso en pacientes con un estado general deficiente. En pacientes con buen estado general que presentan tumores primitivos con previsible respuesta al tratamiento oncológico y posibilidad de una supervivencia más prolongada, como los cánceres de mama, los linfomas y algunos tumores broncopulmonares, se deben utilizar terapéuticas más agresivas dirigidas a intentar tratar la lesión tumoral pleural y evitar la recidiva del derrame.

La pleurodesis actúa directamente sobre la lesión pleural y tiene como objetivo provocar la sínfisis de las hojas pleurales parietal y visceral, colapsar la cavidad pleural y evitar la recidiva del derrame. Se puede realizar mediante la instilación en la cavidad pleural de algún agente irritante. Las características que deben presentar estos productos son: alta efectividad sinfisiante, ausencia de efectos adversos, bajo coste y fácil disponibilidad.

Se han utilizado diversos productos: antibióticos como la tetraciclina y la doxiciclina; citostáticos como la bleomicina, el cisplatino, la doxorubicina, el etopósido, la mitomicina C y el 5-fluoruracilo; productos biológicos como el interferón beta (INF  $\beta$ ) o la IL-2; adhesivos de fibrina; colágeno; talco, etc.

Diversos estudios multicéntricos y aleatorizados han demostrado que tras diversas comparaciones entre distintos productos, el mayor efecto sinfisiante se logra mediante la utilización de talco [77], bien en solución acuosa o como polvo seco [78]. El mecanismo por el que se produce la pleurodesis está en relación con las características irritantes del talco y la inflamación que provoca en la serosa pleural. La aplicación de talco tras la videotoracoscopia y su difusión por

toda la cavidad pleural, controlada mediante visión directa, permite lograr una pleurodesis efectiva en más del 90% de las ocasiones. Las complicaciones debidas a esta técnica son escasas, principalmente fiebre y dolor, aunque en algunas ocasiones se ha descrito la aparición de distrés respiratorio y edema pulmonar.

Las actuaciones quirúrgicas quedan limitadas generalmente al tratamiento de los derrames pleurales recidivantes en pacientes con una perspectiva de vida algo más elevada. En estos casos se puede implantar una válvula unidireccional pleuroperitoneal que derive el líquido pleural hacia la cavidad peritoneal donde puede ser más fácilmente reabsorbido [48]. Generalmente se colocan bajo anestesia general, aunque también pueden colocarse con anestesia local si el estado general del paciente no permite ser anestesiado.

En los pacientes con derrames pleurales recidivantes y una expectativa de vida prolongada se ha propuesto el tratamiento quirúrgico del proceso, realizando una pleurectomía o resección pleural, bien por toracotomía o mediante videocirugía, que trataría el proceso tumoral y evitaría la aparición de nuevos derrames.

La radioterapia local sobre el hemitórax afectado puede estar indicada en el contexto del tratamiento del tumor primitivo, cuando resulta radiosensible como ocurre en los linfomas. Actualmente está desestimada la aplicación de sustancias radioactivas intrapleurales, principalmente el Au coloidal, debido a su baja efectividad, elevada tasa de complicaciones y riesgo de irradiación ambiental.

El tratamiento oncológico sistémico mediante quimioterapia no está inicialmente indicado en los derrames pleurales malignos y sólo debe aplicarse cuando el tumor primitivo es sensible y responde a ese tipo de terapia, como

ocurre en los cánceres de mama, los carcinomas pulmonares de célula pequeña y los linfomas. No obstante, últimamente se ha comenzado a tratar estos derrames mediante la aplicación intrapleural de citostáticos, principalmente adriamicina y cisplatino.

La quimioterapia hipertérmica intrapleural es el siguiente paso en el tratamiento de estos procesos y el que ha abierto nuevas perspectivas sobre la mejoría de su evolución y el incremento de la supervivencia [2,79,80].

## **4.- Mecanismos de la muerte celular y su modulación por agentes terapéuticos**

### **4.1.- Necrosis y apoptosis**

#### **4.1.1.- Introducción**

La muerte celular es un proceso que ocurre en el desarrollo de todos los seres vivos multicelulares. La importancia y enorme trascendencia que el conocimiento de los fenómenos relacionados con la muerte celular tiene en la actualidad justifica que en el año 2002 el Premio Nobel de Medicina y Fisiología fuera concedido a los británicos Sydney Brenner y John E. Sulston y al estadounidense Robert Horvitz, “por sus descubrimientos concernientes a la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada”.

Clásicamente se han descrito dos mecanismos con diferentes características morfológicas y bioquímicas, que se consideran los principales responsables de la muerte celular: la necrosis y la apoptosis [81].

## **4.2.- Necrosis**

### **4.2.1.- Concepto**

La necrosis (término procedente del griego que significa “mortificación”), también denominada oncosis, es la muerte celular que aparece como respuesta a un proceso lesivo o patológico que produce en la célula graves alteraciones de los mecanismos de adaptación y resistencia, con afectación definitiva de la función normal celular que desemboca en 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 alteraciones inflamatorias tisulares con graves efectos secundarios como fibrosis y cicatrización.

### **4.2.2. Características morfológicas y bioquímicas**

En la necrosis se produce una alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática que permite la entrada anormal de iones, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ , 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).

Las características más significativas de la necrosis y las que permiten su identificación son la destrucción celular con dispersión irregular de sus restos, y la disgregación desordenada y anárquica del ADN, que en electroforesis en gel de agarosa se manifiesta como una imagen de banda continua (Tabla IV).

## **4.3.- Apoptosis**

### **4.3.1.- Concepto**

El término apoptosis (derivado del griego y que significa “caída de la hoja de los árboles en otoño o de los pétalos de la flor al marchitarse”), fue propuesto en 1972 por Kerr et al. [82] para describir las características de un modo común de muerte celular programada que habían observado repetidamente y sin explicación aparente, en cultivos celulares. A diferencia de la necrosis afecta a células aisladas o grupos celulares reducidos.

Actualmente se considera que la apoptosis es un proceso fisiológico, controlado genéticamente, en el que una célula diseña y ejecuta el programa de su propia muerte de forma natural, como ocurre en algunas modificaciones fisiológicas (desaparición de las membranas interfalángicas en los humanos), o como respuesta a una serie de estímulos o señales que pueden originarse en la propia célula o en las células adyacentes.

Es esencial tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta y permite a los organismos pluricelulares mantener la homeostasis o equilibrio celular de los órganos y tejidos mediante la eliminación controlada de las células innecesarias, envejecidas o dañadas.

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.

En los tejidos adultos sanos, el correcto equilibrio entre la mitosis y la apoptosis permite la estabilidad tisular que se distorsiona cuando existen alteraciones en el funcionamiento de los genes responsables de su regulación. Un incremento de la apoptosis es la causa de diversos procesos patológicos: síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, etc.), síndromes mielodisplásicos, daño isquémico, etc. Por contra, la inhibición de la apoptosis es el principal mecanismo responsable de la aparición de procesos neoplásicos y de enfermedades autoinmunes.

#### **4.3.2.- Características morfológicas y bioquímicas**

La apoptosis se inicia por deshidratación y pérdida del agua intracelular con la aparición de una serie de alteraciones morfológicas específicas que se caracterizan por 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 (Tabla V).

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.

Coincidiendo con estos cambios de la membrana, se produce un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, condensación del mismo, engrosamiento del retículo endoplásmico y alteración de los orgánulos citoplasmáticos que modifican su estructura, excepto las mitocondrias que la mantienen intacta prácticamente hasta el final.

El núcleo disminuye su tamaño, la cromatina se condensa en forma de semiluna en la perifería nuclear, se destruyen los nucleolos y el ADN se disgrega de forma regular debido a la actuación de las endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La membrana nuclear sufre degradación proteolítica y se desintegra con fragmentación del núcleo y dispersión de sus restos por el citoplasma.

Se producen alteraciones en la mitocondria con pérdida de su potencial de membrana y salida de componentes intramembranosos al citoplasma. El proceso culmina con la fragmentación del citoplasma en corpúsculos denominados **cuerpos apoptóticos**, que contienen restos nucleares y citoplásmicos rodeados completamente de membrana plasmática con residuos de fosfatidilserina en su cara externa.

La célula disgregada en forma de cuerpos apoptóticos es eliminada discretamente mediante fagocitosis por los macrófagos y por las células adyacentes sin producir reacción inflamatoria ni alteración tisular. La duración de la apoptosis es variable, de 30 a 60 minutos en cultivos celulares, aunque en algunas células como los hepatocitos puede durar hasta 3 horas.

Una característica específica y precoz de la apoptosis es la presencia de residuos de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana citoplásmica. La otra característica significativa y determinante de la destrucción celular por apoptosis es que se realiza una fragmentación regular del ADN mediante la actuación de las endonucleasas que seccionan las cadenas a nivel de los nucleosomas formando múltiples fragmentos de longitud similar (de aproximadamente 180 a 200 pares de bases), que son detectados en electroforesis en gel de agarosa mediante la aparición de bandas regulares de precipitación o “patrón en escalera” [83] (Tabla VI).

#### **4.3.3.- Mecanismos desencadenantes de la apoptosis**

La apoptosis es un proceso complejo, regulado genéticamente, en el que la célula, tras recibir una serie de estímulos o señales, propios o externos, inicia el mecanismo de su destrucción controlada. Los estímulos desencadenantes son diversos: pérdida de cohesión con las células adyacentes, presencia de ciertas

citocinas, alteraciones en el ADN, pérdida de factores de crecimiento, presencia de radicales libres, aumento de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.

La correcta realización de este proceso de muerte controlada requiere la activación y ejecución coordinada de varios mecanismos en los que intervienen una serie de moléculas, unas efectoras que actúan iniciando el proceso, y otras reguladoras que controlan su evolución.

#### **4.3.4.- Fases de la apoptosis**

En la apoptosis se diferencian **cuatro fases**:

**Fase inicial o de producción del estímulo.** Determinados factores medioambientales o alteraciones celulares producen unas señales o estímulos que alertan a la célula sobre su especial situación y la necesidad de su regularización, reparación o destrucción.

**Fase efectora o de captación de la señal.** La célula capta el estímulo recibido y lo transmite a los mecanismos celulares encargados de la activación de la apoptosis.

**Fase de ejecución o degradativa.** En esta fase se activan los mecanismos efectores y reguladores (inductores o represores) de la apoptosis. Se realiza un balance de la situación celular y, dependiendo de su estado, la célula puede reparar sus lesiones y mantener su integridad y viabilidad o, si las alteraciones no son recuperables o la célula ha cumplido su misión, activar los mecanismos de la apoptosis que desencadenan una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas celulares que provocan su muerte controlada. En este caso, se completa la destrucción celular mediante la condensación de la cromatina y la degradación regular del ADN.

**Fase de eliminación.** Los cambios celulares, controlados fisiológicamente, permiten la creación de los cuerpos apoptóticos que están totalmente rodeados de membrana citoplasmática con residuos de fosfatidilserina en el exterior que son detectados y fagocitados por los macrófagos y por las células adyacentes sin producir alteración inflamatoria local.

#### **4.3.5.- Vías de activación de la apoptosis**

Existen **dos vías** principales de inducción de la apoptosis, una **extrínseca** en la que las señales de destrucción celular proceden del exterior de la célula y son captadas por diversos receptores de muerte de la membrana celular, y otra **intrínseca** en la que es la propia célula la que inicia su proceso de destrucción ante la aparición de estímulos internos como falta de factores de crecimiento o alteración de los mecanismos reguladores de su desarrollo.

##### **4.3.5.1.- Vía extrínseca o de los receptores de muerte**

En la membrana celular existen una serie de receptores especializados de muerte formados por complejos proteicos, que pertenecen a la familia de genes del receptor TNF (Tumor Necrosis Factor), cuyos miembros se caracterizan por presentar un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio

intracelular, denominado dominio de muerte DD (Death Domain) [84], que sirve para unir el receptor de muerte de membrana con el resto de la maquinaria apoptótica. Cuando un estímulo o ligando se une a estos receptores puede desencadenar el mecanismo de la apoptosis de la célula.

El receptor de muerte más estudiado y mejor conocido es el CD95 o Fas que se activa al unirse a su ligando (FasL) y permite la transducción de la señal apoptótica. Cuando el receptor de membrana se activa, se produce una serie de alteraciones en el dominio de muerte intracelular DD con la captación de una proteína FADD (Fas-Associated Death Domain), formando el complejo de señalización inductor de muerte DISC (Death-Inducing Signalling Complex) que pone en marcha la apoptosis mediante la activación de unas sustancias iniciadoras específicas, denominadas **caspasas** [85].

Esta vía se inhibe cuando al complejo DISC se une el factor proteico FLIP (FLICE-Inhibitory Proteins) que actúa como un potente inhibidor de la apoptosis. De igual manera ocurre con el receptor de membrana TNF. Una vez activado, si su porción intracelular contacta con complejos intermedios como Tradd (TNF Receptor Associated Death Domain) y Raidd (Receptor Associated Interleukine Death Domain) se activan caspasas inductoras de la apoptosis, pero si se une a un complejo Traf (TNF receptor associated factor), se inhibe la apoptosis y se activa un grupo diferente de proteínas que estimulan la proliferación celular.

#### **4.3.5.2.- Vía intrínseca o mitocondrial**

La vía intrínseca o mitocondrial se inicia a partir de señales intracelulares relacionadas principalmente con la afectación de la célula debida a privación de factores de crecimiento, acción de agentes citotóxicos, etc. La regulación de

esta vía se realiza por una familia de proteínas denominadas **Bcl-2** que controlan la apoptosis actuando sobre la mitocondria.

En esta familia de proteínas se diferencian tres grupos, dos de proteínas proapoptóticas y otro de proteínas antiapoptóticas. La activación de las proteínas proapoptóticas produce una alteración en la membrana de la mitocondria permitiendo la salida al citoplasma de una serie de proteínas, entre ellas el **citocromo c** (componente de la cadena transportadora de electrones necesaria para la respiración mitocondrial), que se une a proteínas del citoplasma y forma un complejo proteico denominado **apoptosoma** que activa las caspasas e inicia la apoptosis. Por el contrario, la actuación de las proteínas antiapoptóticas, estabiliza la membrana mitocondrial, impide la salida del citocromo c y frena la actuación de las caspasas.

Ambas vías están interrelacionadas y convergen en la activación de una serie de proteínas, las caspasas, que junto con la familia de proteínas Bcl-2 son las responsables directas de iniciar o frenar la apoptosis. Los mecanismos específicos de su actuación requieren un estudio más preciso de estas sustancias.

#### **4.3.6.- Caspasas**

Los cambios morfológicos que aparecen en las células apoptóticas se deben principalmente a una serie de sustancias que se denominan caspasas y corresponden a un grupo de cistein-proteasas que se caracterizan por hidrolizar las proteínas después del aminoácido aspartato [86]. Las caspasas responden al estímulo apoptótico activando una cascada proteolítica intracelular que actúa sobre diferentes sustratos celulares y provoca la destrucción de la célula.

En la actualidad hay descritas 14 caspasas que pueden dividirse en dos familias; una que interviene en los fenómenos inflamatorios en respuesta a citocinas (caspasas 1, 4, 5 y 14), y otra, que participa en los fenómenos de la apoptosis [87] y está formada por al menos 8 caspasas que comparten similitudes en su estructura, en la secuencia de aminoácidos y en la especificidad de los sustratos.

Se sintetizan como proenzimas inactivas denominadas procaspasas que tienen que activarse por proteólisis para poder realizar su función catalítica y proteolizar a su vez sus sustratos, siempre tras un residuo de ácido aspártico [88]. Las caspasas inactivas pueden activarse a través de las caspasas activas realizando una actuación escalonada o en cascada.

Las que intervienen en la apoptosis pueden dividirse en dos grupos: las iniciadoras (caspasas 8, 9, 10 y 12, y probablemente 2), que se activan en respuesta a señales de daño celular o estímulos apoptóticos, y las efectoras o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) que son activadas por las iniciadoras y actúan sobre los sustratos celulares produciendo su proteólisis y provocando la desestructuración de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis [89].

La principal caspasa efectora es la 3 que es responsable de la degradación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la formación de los cuerpos apoptóticos. Esta caspasa ha sido identificada en muchos procesos neoplásicos: carcinoma broncopulmonar, neuroblastoma, linfoma, etc.

Las caspasas son también responsables de que la fosfatidilserina, que se encuentra en la cara interna de la membrana citoplasmática de las células sanas, se sitúe en la cara externa de la membrana, como ocurre en las células apoptóticas y permite que estas células atraigan a los macrófagos y sean fagocitadas discretamente por ellos.

Las caspasas intervienen en ambas vías del mecanismo de la apoptosis. En la vía extrínseca, los receptores de membrana poseen un dominio intracitoplasmático, el dominio de muerte (DD), responsable de la activación de la apoptosis cuando un ligando o estímulo se une al receptor. Si el receptor de membrana Fas se activa, se produce una reacción en el dominio de muerte intracelular que capta una serie de moléculas adaptadoras FADD (Fas Associated protein with a Death Domain) que provoca la activación de la caspasa inductora 8, desencadenando una activación en cascada de caspasas que concluirá en la activación de la caspasa efectora 3.

Por su parte, en la vía intrínseca, los estímulos apoptóticos alteran la membrana mitocondrial y permiten la salida al citoplasma del citocromo c y otras proteínas que se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria. El citocromo c se une a un cofactor de proteínas, Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1), presente en el citoplasma, mediante un proceso ATP (adenosin trifosfato) dependiente y permite la captación de procaspasa 9, formando el complejo denominado apoptosoma que es el responsable de la activación de la caspasa 9 por un cambio conformacional y no proteolítico. La caspasa 9 actúa como activadora de la caspasa 3 que efectúa la destrucción de la célula.

#### **4.3.7.- Familia de proteínas Bcl-2**

El principal mecanismo regulador intracelular de la apoptosis está constituido por un grupo de proteínas similares al gen Bcl-2 que se sintetizan

principalmente en la membrana de la mitocondria [90]. Tienen en común que conservan al menos uno de los cuatro dominios de similitud con el gen Bcl-2, denominados BH1 a BH4 (Bcl-2 Homology). Esta familia de proteínas consta, por el momento, de 21 miembros que se clasifican en tres grupos dependiendo de sus características estructurales y funcionales.

El grupo I está formado principalmente por las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w y Mcl-1, que se caracterizan por conservar los cuatro dominios BH y realizar actividad antiapoptótica. Concretamente, Bcl-2 protege a la célula de la muerte inducida por TNF y Fas impidiendo la formación y actuación de radicales libres de oxígeno [91].

El grupo II está constituido por las proteínas Bax y Bak que carecen del dominio BH4 y presentan actividad proapoptótica mediante la salida del citocromo c de la mitocondria, la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas [92].

El grupo III es el más amplio y se caracteriza porque todos sus miembros presentan exclusivamente el dominio BH3. Son también proapoptóticas y en este grupo destacan: Bid, Bad, Bim y Bik [93], pero sólo pueden realizar su labor apoptótica si están en presencia de Bax y Bak [94]. Muchas de estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a las membranas de la mitocondria y el núcleo y al retículo endoplásmico pudiendo lesionar dichas estructuras [95].

La labor fundamental de esta familia de proteínas es regular la liberación de factores proapoptóticos, principalmente el citocromo c, para lo cual forman heterodímeros entre las proteínas de los grupos pro y antiapoptóticos. El predominio de unas u otras determinará si finalmente se produce la apoptosis. La unión de una proteína antiapoptótica como Bcl-2 o Bcl-XL con una proteína proapoptótica Bax forma un heterodímero. El predominio en esta unión de Bax

determinará la apoptosis celular, mientras que si existe predominio de la proteína antiapoptótica la célula no se destruirá.

Algunas células tumorales se caracterizan por ser incapaces de iniciar la apoptosis ante ciertos estímulos fisiológicos o ante la presencia de agentes quimioterápicos debido a que presentan una sobreexpresión del gen Bcl-2 que tiene actividad antiapoptótica, promueve la supervivencia celular y permite la transmisión de mutaciones y la transformación neoplásica de la célula.

#### **4.3.8.- Interacción entre las vías mediadoras de la apoptosis**

Las vías intrínseca y extrínseca están interconectadas a través de algunas de las proteínas proapoptóticas del grupo que sólo presenta el dominio BH3, principalmente Bid. La activación de los receptores de muerte de membrana (vía extrínseca) induce la formación de DISC y la activación de caspasa 8 que, además de activar la cascada de las caspasas, es capaz también de activar Bid e iniciar una activación en cadena de Bax que induce en la mitocondria la salida del citocromo c, activándose así la vía intrínseca.

Algunas células precisan para la apoptosis, la activación de las dos vías mediante este mecanismo anteriormente indicado en el que la activación de las caspasas depende de la translocación de Bid activado a la mitocondria, la oligomerización de Bax y Bak y la salida al citoplasma del citocromo c [96].

#### **4.3.9.- Implicación de la mitocondria en la apoptosis**

La mitocondria es uno de los componentes celulares que se encuentra más intensamente implicado en la apoptosis desempeñando dos funciones primordiales: aportar la energía, en forma de ATP, necesaria para producir el proceso de muerte celular programada, y permitir la salida al citoplasma de proteínas proapoptóticas procedentes de su membrana, principalmente citocromo c, factor inductor de la apoptosis AIF (Apoptosis-Inducting Factor), Smac/Diablo (Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP-Binding Protein with Low pI), procaspasas 2, 3 y 9, y otras proteínas, que desencadenan la ejecución de la apoptosis activando la vía dependiente de caspasas que van a provocar una importante caída del potencial de membrana mitocondrial y un incremento en la salida al citoplasma del citocromo c con reactivación de la cascada de caspasas que determinan la fase final de la apoptosis provocando la muerte celular por degradación definitiva del ADN nuclear mediante la activación de la nucleasa Cad (Caspase-Activated DNase).

La alteración del normal funcionamiento del metabolismo mitocondrial va a facilitar el incremento de la producción de radicales libres de oxígeno que alteran también el potencial de membrana de la mitocondria y facilitan aún más la salida de citocromo c al citoplasma.

#### **4.3.10.- Inhibidores y reguladores de la apoptosis**

##### **4.3.10.1.- Proteínas inhibidoras de la apoptosis**

En las células existen también otros mecanismos que actúan impidiendo la muerte celular programada y están constituidos por proteínas inhibidoras de la apoptosis IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) [97] que pueden actuar bloqueando la activación de caspasas de ambas vías. En los mamíferos se han descrito al menos cinco proteínas con características antiapoptóticas: XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), c-IAP1, c-IAP2, IAP neuronal y survivina [98].

Las proteínas IAP bloquean múltiples estímulos apoptóticos entre los que destacan los receptores de TNF, proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, citocromo c, etc. Las proteínas XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 inhiben las caspasas 3 y 7 y la procaspasa 9. Las IAP frenan la apoptosis uniéndose, inhibiendo o degradando las caspasas [99]. Como se ha indicado anteriormente, la vía extrínseca se inhibe selectivamente cuando al complejo DISC se une el factor proteico FLIP (FLICE-Inhibitory Proteins) que actúa como un potente inhibidor de la apoptosis.

##### **4.3.10.2.- Proteínas de choque térmico**

Las proteínas de choque térmico HSP (Heat-Shock Proteins) son una familia de proteínas que se activan en respuesta al estrés celular y tienen como función proteger a la célula mientras intenta reparar el daño celular, frenando o impidiendo la apoptosis [100]. Algunas de estas proteínas inhiben la formación del apoptosoma por diferentes vías. Así, HSP 70 actúa por un doble mecanismo; por una parte se une a Apaf-1, impidiendo la activación de procaspasa 9 [101] y

además puede unirse e inhibir a AIF. HSP 90 se une a Apaf-1 impidiendo su oligomerización e inhibiendo la formación del apoptosoma. HSP 27 se une y secuestra el citocromo c y la procaspasa 3 [102].

#### **4.3.10.3.- Gen p53**

Existen también otros mecanismos celulares que actúan regulando estrechamente la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células y que influyen de manera determinante en el mecanismo de la apoptosis. Así, el gen p53, denominado “guardián del genoma”, está implicado en el control del ciclo celular y la apoptosis.

En normalidad, se encuentra en las células en escasa cantidad e inactivo. Cuando se produce lesión del ADN, debida a alteraciones fisicoquímicas, modificaciones oncogénicas, etc., el p53 se activa por fosforilización e impide el desarrollo descontrolado de la célula por dos mecanismos: deteniendo el ciclo reproductivo celular para facilitar la reparación del ADN y evitar la aparición de células anómalas, e induciendo la apoptosis si la célula se encuentra irreversiblemente dañada [83].

El p53 actúa también disminuyendo la transcripción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y aumentando la de la proapoptótica Bax. La mutación o inactivación del p53 está relacionada con la aparición de múltiples procesos neoplásicos. Además, la resistencia de ciertos tumores al tratamiento con quimioterápicos se debe a una deficiencia de este gen.

## **5.- Hipertermia en Oncología**

### **5.1.- Hipertermia**

En condiciones normales, la temperatura humana es de 36 a 37 grados centígrados (°C). Esta temperatura se mantiene constante mediante la termorregulación, actividad controlada por el sistema nervioso central y que permite realizar todos los procesos vitales del organismo.

El término hipertermia procede del griego y significa elevación de la temperatura corporal. Este aumento de la temperatura puede utilizarse con fines terapéuticos mediante la aplicación de calor a una temperatura superior a los niveles fisiológicos sobre todo el organismo, o una parte limitada del mismo. Dependiendo del foco térmico y del método de aplicación, la energía calórica se propaga por varios mecanismos, conducción, convección o radiación. El calor provoca en el organismo una elevación de la temperatura con una serie de alteraciones loco-regionales o generales acompañadas de diversos efectos, desde terapéuticos hasta nocivos, según el nivel térmico alcanzado.

El incremento de temperatura pone en marcha el mecanismo de la termorregulación con la aparición de diversos cambios fisiológicos. El más significativo es una reacción vasomotora que se acompaña de vasodilatación con incremento del flujo vascular. Al calentarse, la sangre se alcaliniza, disminuye su viscosidad y llega con más facilidad a los tejidos.

Con temperaturas moderadas, en el rango de los 37 a los 40 °C, el mayor aporte de sangre caliente permite que se produzca una mayor llegada de nutrientes a las células con incremento de su metabolismo y mejor eliminación

de los productos de desecho. Con temperaturas más elevadas, por encima de los 40 °C, se producen alteraciones metabólicas con modificaciones citoestructurales que, si aumenta la temperatura, pueden inducir o provocar la destrucción celular. La aplicación de calor en una zona determinada y con una intensidad superior a la tolerancia celular tiene un efecto cauterizante y produce la destrucción de la célula lo que ocurre cuando se alcanzan temperaturas superiores a los 46 °C.

## 5.2.- Utilidad de la hipertermia en Oncología

Aplicada a la oncología, la hipertermia es el tratamiento de procesos neoplásicos mediante la administración de energía térmica de forma invasiva o no invasiva, lo que produce calentamiento del tumor y de los tejidos adyacentes. Se puede aplicar de forma **local** (mediante fuentes de energía internas o externas), **regional** (por perfusión de órganos o miembros, o irrigación de cavidades) y **general** [103]. La hipertermia corporal total presenta limitaciones fisiológicas y el empleo de temperaturas superiores a los 45 °C no es clínicamente realizable pues por encima de los 42 °C las complicaciones aumentan exponencialmente [104]. En clínica humana su aplicación ha mostrado ser de interés utilizada en el rango de los 40 a los 43 °C.

Todas las células son sensibles al calor y la aplicación de una elevada temperatura durante un cierto tiempo produce una serie de alteraciones que pueden provocar su destrucción. El calor influye en la proliferación celular, principalmente en las fases M y S del ciclo mitótico [104]. Numerosos estudios han demostrado que el aumento de calor produce alteraciones celulares [105] con incremento de la actividad metabólica y desestabilización de las

macromoléculas intracelulares (lípidos, carbohidratos, aminoácidos, etc.), que pierden su actividad biológica.

Por otra parte, tanto en experiencias *in vitro* como en experimentación animal se ha comprobado que el calor inactiva las células tumorales que se encuentran en condiciones de hipoxia [104]. A pesar de estos datos, los mecanismos íntimos de la destrucción celular inducida por la hipertermia, no han sido aún claramente establecidos.

Debido a las alteraciones estructurales de las proteínas de membrana producidas por la hipertermia, las primeras manifestaciones detectables son aumento del volumen y del espesor de las membranas celulares. Además, el calor también produce alteración en la actividad mitocondrial e inhibición de la síntesis de proteínas, ADN y ARN [6]. A estos hechos y 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. En resumen, parece que la hipertermia actúa principalmente aumentando la permeabilidad de las membranas [6], alterando la actividad mitocondrial y destruyendo las uniones intermembranas.

Los efectos de la hipertermia en la fisiología celular están directamente relacionados con la dosis de calor (grados de temperatura por tiempo de exposición a la misma) [104] y la diferente sensibilidad que las células presentan al aumento de temperatura, lo que se conoce como termosensibilidad. La dosis de calor requerida para producir la muerte celular es diferente dependiendo del tipo de célula y de los factores medioambientales. Por tanto, para plantear una terapia hipertérmica es necesario determinar la termosensibilidad de cada tumor y evaluar la proporción de células que sobreviven a una temperatura determinada [80].

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 [103,104]. En muchos tejidos tumorales el flujo vascular está disminuido, lo que provoca alteración del metabolismo celular con hipoxia, acúmulo de materiales de desecho y acidosis [103]. Además, los tejidos menos vascularizados son más sensibles al calor, lo que hace que en esta situación la aplicación de terapias oncológicas basadas en la hipertermia presente efectos beneficiosos sobre la destrucción tumoral.

Corroborando estos hechos, ya en diversos estudios de los años 1970 y 1980 se pudo comprobar que la aplicación de calor con temperaturas superiores a los 43 °C induce la muerte de las células tanto en cultivos celulares como en experimentos con animales [106]. La cuantificación de los efectos celulares debidos a la hipertermia mediante 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 [79].

### **5.3.- Radioterapia y Quimioterapia hipertérmicas**

Basados en el poder citotóxico del calor y en su efecto modulador de la sensibilidad de las células neoplásicas a los agentes quimioterápicos, la hipertermia se está utilizando en oncología desde los años 1970, como un agente sensibilizador de las células tumorales a los efectos de la RT y la QT [104]. Diferentes estudios randomizados han demostrado su utilidad, aunque no se han identificado ni se conocen claramente los mecanismos responsables de estos efectos beneficiosos [107].

Se ha comprobado que 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 [106].

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 [108]. 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 como el p53, Bcl-2 y Bax [109]. 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 [110].

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.

La aplicación adyuvante a este procedimiento de quimioterapia intrapleural, utilizando principalmente cisplatino, en pacientes con mesotelioma maligno pleural, demuestra una importante respuesta farmacocinética y satisfactorios resultados en el control de la neoplasia, evitando los efectos indeseables de la QT sistémica y logrando mejorar discretamente las tasas de supervivencia [73].

## **6.- Muerte celular inducida por agentes terapéuticos: hipertermia y quimioterapia**

Recientes estudios [111,112] 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.

Un aumento de la temperatura produce en la célula una serie de alteraciones que se caracterizan por 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 en el entorno celular provoca disminución del potencial de membrana mitocondrial con liberación del citocromo c desde el interior de la mitocondria al citoplasma, activación de Bid e inducción de la apoptosis por la vía Fas mediada por caspasas [111].

El aumento de la temperatura a 42 °C produce la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria, activación de las caspasas 3 y 8 y aumento significativo en la externalización de Fas [112]. La temperatura elevada también produce un incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  que se acompaña de disminución de los niveles de HSP 70 y fosforilización de otras proteínas de choque térmico que actúan disminuyendo el potencial de

membrana de la mitocondria y permiten la liberación de factores desencadenantes de la apoptosis [113].

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, principalmente p53, Bcl-2 y Bax, que influyen significativamente en la muerte celular [109].

## **7.- Técnicas para la detección de muerte celular**

La muerte celular es un proceso que cursa con alteraciones morfológicas y bioquímicas que presentan diferentes características dependiendo del tipo de muerte: necrosis o apoptosis y del momento evolutivo en el que se encuentre la célula. Estas características precoces o tardías de la muerte celular que se han descrito anteriormente pueden detectarse por diferentes métodos y técnicas (Tabla VII).

### **7.1.- Microscopía**

Es el mecanismo más elemental para determinar los cambios morfológicos celulares. La tinción de las células con hematoxilina eosina y su observación con microscopía óptica permite detectar alteraciones precoces del deterioro celular como cambios de la forma y el tamaño. En la necrosis se aprecia edema celular con aumento de tamaño, mientras en la apoptosis aparece condensación del citoplasma con la formación de vesículas y protuberancias y condensación de la cromatina.

En fases más avanzadas se observa rotura de las membranas y dispersión de las estructuras celulares en la necrosis, mientras en la apoptosis se aprecia integridad de la membrana citoplasmática, que la cromatina adopta forma de semiluna densa y se sitúa en la perifería del núcleo y la formación de prolongaciones celulares que dan lugar a los cuerpos apoptóticos.

Mediante la microscopía electrónica se pueden detectar cambios ultraestructurales como: alteraciones mitocondriales y del retículo endoplásmico, cambios en las microvellosidades, desestructuración de los desmosomas, etc. En la necrosis se aprecia floculación de la cromatina nuclear y su dispersión en acúmulos indefinidos junto con rotura de las membranas nuclear y citoplasmática. En la apoptosis la cromatina se aprecia en forma de corpúsculos uniformes de elevada densidad y se observa la integridad de la membrana citoplasmática en los cuerpos apoptóticos.

## **7.2.- Detección de la degradación del ADN por electroforesis**

Su demostración es un signo determinante de la destrucción celular, bien por necrosis o por apoptosis. Se puede comprobar por electroforesis en gel de agarosa. En la necrosis se produce una fragmentación irregular del ADN con la formación de múltiples partículas sin un patrón definido que se manifiesta por una imagen en forma de mancha o de banda continuada. La apoptosis se caracteriza por la fragmentación ordenada del ADN debido a la actuación de endonucleasas que seccionan las cadenas de ADN en fragmentos regulares que contienen de 180 a 200 pares de bases. Estas secciones de ADN pueden detectarse mediante electroforesis mostrando el característico “patrón en escalera” [83]

### **7.3.- Técnicas de inmunohistoquímica**

Una de las más utilizada es la técnica TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labelling) [114] que consiste en la señalización del ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos terminales que han quedado expuestos tras la fragmentación de las cadenas de ADN por las endonucleasas. La detección de la destrucción nuclear se comprueba mediante microscopía observándose que los núcleos degradados presentan una coloración rojiza. La utilización de diferentes tipos de tinciones permite diferenciar las células que han sufrido necrosis de las que han presentado apoptosis. También por técnicas de inmunohistoquímica es posible la detección de las caspasas, principalmente la caspasa 3, lo que permite detectar células que se encuentran en la fase de ejecución de la apoptosis.

### **7.4.- Citometría de flujo**

Permite cuantificar las células que presentan sus núcleos fragmentados por la apoptosis y que han sido marcados por diversas técnicas [115]. El marcaje de los hidroxilos terminales de los fragmentos de ADN puede ser también realizado con fluoresceína. En estos casos, la detección de los núcleos destruidos se realiza por microscopía fluorescente o por citofluorometría.

## **7.5.- Evaluación de la simetría de la membrana celular**

La pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática es una de las alteraciones que aparecen precozmente en la apoptosis. La fosfatidilserina que se encuentra orientada hacia el interior de la célula en las membranas citoplasmáticas normales, se manifiesta hacia el exterior en las células apoptóticas, lo que permite que sea detectada con determinados productos.

### **7.5.1.- Anexina V**

La anexina V es una proteína que no es capaz de difundir a través de la membrana celular y que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, por lo que las células marcadas con anexina V son células que presentan residuos de fosfatidilserina en el exterior de la membrana y que se encuentran en la fase de inicio de la apoptosis [116]. La utilización de anexina V unida a fluoresceína (Anexina V-FITC) permite detectar la presencia de fosfatidilserina por fluorescencia [117] en el exterior de la célula y determinar la presencia de apoptosis mediante citometría de flujo.

### **7.5.2.- Ioduro de propidio**

La tinción con ioduro de propidio (IP) permite detectar la integridad de la membrana celular ya que a bajas concentraciones es capaz de penetrar en las células necróticas por lo que es un marcador de la fase final de la apoptosis y de la necrosis celular.

La mezcla de las técnicas de tinción con anexina V y ioduro de propidio permite determinar la necrosis celular o la fase de la apoptosis en la que se encuentra la célula.

Los métodos más fiables para la detección de necrosis y apoptosis son la determinación de las alteraciones morfológicas comprobadas por microscopía óptica y electrónica, la técnica TUNEL y la detección de cambios en la simetría y en la permeabilidad de la membrana celular mediante las tinciones con anexina V y ioduro de propidio.

## **8.- Mecanismos de señalización biomolecular del daño celular**

### **8.1.- Citocinas**

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., sustancias que tienen capacidad para controlar la actividad de las células en condiciones fisiológicas y patológicas.

#### **8.1.1.- Definición y características**

Las citocinas son sustancias mediadoras polipeptídicas de bajo peso molecular (15 a 30 KDa) constituidas por 120 a 180 aminoácidos, sintetizadas y liberadas por múltiples tipos de células, principalmente las del sistema inmune, 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.

La mayoría son secretadas al espacio extracelular, aunque otras pueden permanecer en el interior de la célula o mantenerse adheridas al exterior de la membrana. Tienen una vida corta y actúan de forma breve e intensa, mientras dura el estímulo desencadenante de su producción, sobre los diferentes receptores de membrana que poseen tanto las células que las producen, como otras células del organismo.

### 8.1.2.- Clasificación

Dependiendo de la célula que las sintetiza, han recibido diversos nombres; así, se han denominado 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.

Desde un aspecto funcional y de acuerdo a sus características y tipo de respuesta a los diferentes estímulos, las citocinas pueden dividirse en cuatro grandes grupos, según participen en los mecanismos relacionados con:

**1) Inflamación:** interleucinas 1, 6, 8, 12 y 16 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

**2) Inmunidad celular:** interleucina 2 (IL-2) e interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ).

**3) Inmunidad humoral:** interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13).

**4) Homeostasis:** interleucina 3 (IL-3) y los factores estimulantes de granulocitos (G-CSF), de monocitos (M-CSF) y de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Tabla VIII).

### 8.1.3.- Funciones biológicas y propiedades

Su función principal es participar como mediadores intercelulares para inducir y regular diversas funciones de las células y múltiples respuestas biológicas: inmunidad, hematopoyesis, inflamación, apoptosis, etc. Las citocinas controlan el sistema inmune, regulando (activando o inhibiendo) la proliferación y diferenciación de diferentes tipos de células y la secreción de anticuerpos y otras citocinas. Entre sus efectos destaca la modulación de la respuesta inmune y de la inflamación, el crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas, la regeneración tisular y la angiogénesis.

Para realizar su función, las citocinas se unen a receptores específicos de las membranas de las células, activando la transmisión de una serie de señales que van a provocar alteraciones en el patrón de comportamiento celular, ocasionando una determinada respuesta biológica.

Su actividad puede realizarse a diferentes niveles y su acción puede ser:

**1) Autocrina**, cuando actúan sobre receptores de la propia célula que las sintetiza.

**2) Paracrina**, cuando actúan en el entorno celular próximo al lugar de secreción.

**3) Endocrina** cuando son vehiculadas por la sangre o el plasma y realizan su acción sobre órganos o tejidos distantes. (Tabla IX)

Entre sus propiedades destacan [11]:

**1) Pleitropía:** una misma citocina posee la capacidad de realizar múltiples efectos biológicos al actuar sobre diferentes células.

**2) Redundancia:** varias citocinas pueden ejercer un mismo efecto sobre diferentes células.

**3) Sinergismo:** dos o más citocinas producen un efecto que se potencia al actuar conjuntamente.

**4) Antagonismo:** varias citocinas pueden inhibirse o bloquearse mutuamente. (Tabla X)

### **8.1.4.- Receptores de citocinas**

Los receptores de membrana de las células sobre los que actúan las citocinas son complejos proteicos glicosilados que presentan una porción extracitoplasmática sobre la que se fija la citocina, una parte transmembranosa y otra porción intracitoplasmática que permite transmitir el estímulo al interior de la célula y activar su reacción. Los receptores de membrana son de alta afinidad y niveles muy bajos de citocinas son capaces de lograr una unión efectiva con el receptor que permite la transmisión de la señal a la célula y la activación del efecto biológico.

La mayoría de estos receptores son complejos proteicos que presentan una cadena específica que se une a la citocina y una cadena común que transmite la señal al interior de la célula y que es compartida por otros receptores de membrana. Estos receptores son diversos, pero según su estructura se pueden clasificar en varios grupos (Tabla XI):

**1) Receptores de inmunoglobulinas (Ig).** Poseen varios dominios extracelulares similares a los de las inmunoglobulinas. A este grupo pertenecen las interleucinas 1 y 16 (IL-1, IL-16).

**2) Receptores de factores de crecimiento hematopoyético.** Se incluyen en este grupo las interleucinas 2, 3, 5, 6, 7, 9, 13, 15 (IL-2, IL-3, IL-5, IL-

6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15) y los factores de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF) y de granulocitos y monocitos (GM-CSF).

**3) Receptores de interferones alfa, beta y gamma** (INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), que presentan dos residuos de cisteína en su porción extracelular.

**4) Receptores de los factores de necrosis tumoral alfa y beta** (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), que se caracterizan por la presencia en el dominio extracelular de varias secuencias, de aproximadamente 40 aminoácidos, ricas en cisteína.

**5) Receptores de quimiocinas**, entre los que destacan: interleucina 8 (IL-8), RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted), y factor activador de plaquetas (PAF).

**6) Receptores de los factores de crecimiento transformador alfa y beta** (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ).

Cada citocina tiene capacidad para unirse a diferentes receptores, al igual que cada receptor puede permitir su unión a diversas citocinas lo que explica sus características de pleitropía, redundancia, sinergismo y antagonismo.

### **8.1.5.- Receptores solubles de citocinas**

Los receptores de citocinas se encuentran unidos a la membrana celular. No obstante, existen también muchos receptores de citocinas que son sintetizados como proteínas solubles independientes y que pueden actuar en lugares alejados de su zona de secreción. Estos receptores solubles actúan

regulando a distancia las diversas funciones de las citocinas. Se producen habitualmente por rotura proteolítica del propio receptor situado en la membrana celular y son eliminados al espacio intercelular.

Pueden realizar diferentes funciones biológicas, aunque generalmente actúan como antagonistas de su receptor equivalente de membrana, impidiendo que la citocina se una al receptor celular y transmita la señal al interior de la célula. La producción elevada de receptores solubles generados a partir de los receptores de membrana por fenómenos de proteólisis provoca una disminución de los receptores funcionantes y una inhibición de la transmisión de la señal a la célula.

La actividad biológica de las citocinas está regulada por una serie de sustancias entre las que destacan los bloqueadores de los receptores y los inhibidores de las citocinas. Los primeros son sustancias proteicas que se fijan y bloquean el receptor e impiden que la citocina actúe sobre la célula regulando la intensidad de la respuesta inflamatoria. Los inhibidores de las citocinas son versiones solubles de los respectivos receptores que liberan un fragmento de su parte extracitoplasmática, se une a la citocina, la bloquea e impide su actuación sobre la célula.

### **8.1.6.- Quimiocinas**

Las quimiocinas son un grupo numeroso de sustancias constituidas por polipéptidos de bajo peso molecular (8 a 14 KDa) con función quimiotáctica, que actúan como promotoras e iniciadoras de la respuesta inflamatoria [118]. Están secretadas por diversas células en respuesta a ciertos estímulos endógenos y

exógenos, e intervienen en la activación de los diferentes tipos celulares leucocitarios (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, etc.) y su migración a los focos inflamatorios.

Presentan las mismas propiedades de pleitropía, redundancia, sinergismo y antagonismo que las citocinas y al igual que ellas también pueden actuar de forma autocrina, paracrina y endocrina. 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.

#### **8.1.6.1.- Clasificación**

Las quimiocinas forman un grupo específico de aproximadamente 40 proteínas que se caracterizan porque todos sus miembros están asociados genéticamente y la mayoría presentan cuatro residuos de cisteína unidos por puentes disulfuro [119] esenciales para la actividad de la molécula.

Dependiendo del número y la posición de los residuos de cisteína en el dominio aminoterminal se clasifican en cuatro grupos o subfamilias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , también denominadas respectivamente: CXC (los dos residuos de cisteína están separados por un aminoácido simple), CC (cuando ambas cisteínas están unidas), C (sólo poseen un residuo de cisteína) y CX<sub>3</sub>C (los dos residuos de cisteína están separados por 3 aminoácidos) [17] (Tabla XII).

**1) Las quimiocinas  $\alpha$  o CXC se dividen en dos grupos, las que poseen 3 aminoácidos ELR (ácido glutámico-leucina-arginina) entre el N-terminal y la**

primera cisteína, y **las que no poseen la secuencia ELR**. Esta secuencia de aminoácidos es necesaria para la actuación de las quimiocinas que activan los neutrófilos [120] y esencial para la unión y activación de sus receptores [121]. Todas ellas se sintetizan y actúan en un gran número de células: monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, NK (Natural Killer), fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, etc., como respuesta a múltiples estímulos.

Presentan gran variedad de efectos biológicos: quimiotaxis de neutrófilos, monocitos, linfocitos T, basófilos, etc., activación y proliferación celular, regulación de la angiogénesis y la hematopoyesis, síntesis de colágeno, liberación de histamina, etc.

En el grupo de las quimiocinas que poseen la secuencia ELR destaca la IL-8, también denominada proteína activadora de neutrófilos 1 (NAP-1), involucrada en la adherencia del neutrófilo al endotelio vascular [122]. Es una de las principales quimiocinas producidas por los neutrófilos y ejerce un efecto autocrino. La IL-8 corresponde a la citocina KC del ratón. También forman parte de este grupo de quimiocinas con secuencia ELR: GRO  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Growth Related Oncogen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y ENA-78 (Epithelial-cell derived Neutrophil-Activating protein 78), que son angiogénicas y potentes quimioatrayentes y activadoras de los neutrófilos. La  $\beta$ -Tromboglobulina pertenece también a este grupo, pero aunque posee la secuencia ELR, no tiene actividad atrayente para los neutrófilos.

En el grupo de las quimiocinas sin secuencia ELR destacan: IP-10 (Interferon-inducible Protein 10) y SDF-1  $\alpha$  y  $\beta$  (Stromal cell-Derived Factor-1  $\alpha$  y  $\beta$ ), que activan linfocitos T y monocitos y son angiostáticas [119].

**2) El grupo de quimiocinas  $\beta$  o CC** es el más numeroso. Se producen en los monocitos, linfocitos T, macrófagos, mastocitos, células endoteliales, etc. Son especialmente quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T, aunque

también actúan sobre eosinófilos, basófilos, linfocitos B, timocitos, etc. [123]. Inducen la activación del endotelio, regulan la degranulación y liberación de enzimas de las células NK, modulan la apoptosis y controlan el crecimiento de las células hematopoyéticas [123]. En este grupo destacan la eotaxina 1 y 2 que son quimiotácticas para los eosinófilos y tienen gran importancia en los procesos alérgicos, RANTES que es quimiotáctica para los linfocitos T, y MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) que es quimioatrayente de monocitos. También forman parte de este grupo MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1  $\alpha$  y  $\beta$  (Macrophage Inflammatory Protein-1), etc.

**3) Las quimiocinas  $\gamma$  o C** están formadas por la linfotactina y SCM-1 (Single C Motif-1). Producidas por los linfocitos T, mastocitos y células NK. Actúan principalmente sobre esas mismas células induciendo su activación y quimiotaxis [123].

**4) El grupo de quimiocinas  $\delta$  o CX<sub>3</sub>C** está constituido por un solo miembro denominado fractalquina o neurotactina que se expresa en las células endoteliales e interviene en la adherencia al endotelio y la quimiotaxis de los monocitos y los linfocitos T.

Algunas citocinas con actividad proinflamatoria (como IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) son las mayores estimulantes para la producción por parte de un gran número y diversidad de células, de quimiocinas CXC y CC [119], que actúan facilitando la activación de las células endoteliales y la migración a su través de los leucocitos. En la inflamación aguda se produce un infiltrado inicial de polimorfonucleares y más tarde de macrófagos y monocitos cuya activación es estimulada por IL-8 y MCP-1, las quimiocinas más activas en su reclutamiento y migración al foco inflamatorio.

### **8.1.6.2.- Receptores de quimiocinas**

Se diferencian de los receptores habituales de citocinas porque estos receptores presentan una estructura característica, de forma serpenteante, con una parte extracitoplasmática corta con un extremo N-terminal, una parte transmembrana con siete dominios y una parte intracelular con un extremo C-terminal [119]. Todos poseen en su parte extracelular dos cisteínas encargadas de formar un puente disulfuro que permite su unión con el ligando [119].

La transmisión de la señal está mediada por nucleótidos de guanina (proteína G) que se encuentran localizados en la parte interna de la membrana citoplasmática asociados al extremo carboxiterminal intracitoplasmático. La porción intracelular del receptor contiene residuos de serina y treonina que son fosforilados tras el estímulo y participan en la activación de enzimas y factores de transducción, los cuales facilitan la transmisión de señales en el interior de la célula y la producción de sustancias específicas dependiendo del tipo de estímulo recibido. Hay una serie de receptores específicos que se unen a un solo ligando, como ocurre con la IL-8, y otros compartidos que se pueden unir a varias quimiocinas de los distintos grupos o familias.

## 8.2.- 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 ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-2}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$ ) y el interferon gamma ( $\text{INF-}\gamma$ ) [124,125], 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 ( $\text{FN}\kappa\beta$ ), 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 [126].

Este proceso condiciona el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) [127] 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 (PCR)).

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) [128,129] 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) [130]. 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 [131]. El factor de crecimiento transformador beta ( $\text{TGF-}\beta$ ) tiene también una poderosa actividad antiinflamatoria [129].

### 8.3.- 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 (Tablas XIIIa, XIIIb y XIIIc):

1) **RANTES** (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted). Quimiocina también denominada CCL5, es una proteína de 8 KDa 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. Con la colaboración de otras citocinas como IL-2 e INF- $\gamma$ , RANTES induce la proliferación y activación de células NK y CHAK (CC-Chemokine-Activated Killer) [132].

2) **MCP-1** (Monocyte Chemotactic Protein-1). También llamado SCYA2 (Small inducible CYtokine A2), MCAF (Monocyte Chemotactic and Activating Factor) y CCL2. Es un polipéptido de 13 KDa formado por 76 aminoácidos que forma parte de la familia SIG (Small Inducible Gene) y desempeña un importante papel en el reclutamiento de monocitos en los focos inflamatorios [133]. MCP-1 se ha encontrado en la orina de pacientes con artritis reumatoide donde actúa reclutando macrófagos y perpetuando la inflamación de las articulaciones. También se ha encontrado elevado en la orina de pacientes con lupus eritematoso utilizándose su presencia como marcador determinante de la nefritis.

3) **MCP-5** (Murine macrophage/monocyte Chemotactic Protein-5). También denominado CCL12 y SCYA12 (Small inducible CYtokine A12). Es un péptido de 9,2 KDa que consta de 82 residuos de aminoácidos y forma parte de la familia de quimiocinas  $\beta$  o CC. Es un potente quimioatrayente de los monocitos humanos [134] 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 28 KDa que pertenece a la familia de las metaloproteinasas e 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 [135]. 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 [136] MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , 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- $\alpha$ , de los fibroblastos y de los macrófagos.

6) **MIP-2** (Macrophage Inflammatory Proteins-2). También llamada CXCL2 y Gro- $\beta$  (Growth-regulated protein  $\beta$ ). Está secretada en los focos inflamatorios por los monocitos y los macrófagos y es quimiotáctica para los leucocitos polimorfonucleares y las células hematopoyéticas [137].

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, como PCR, pero inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, INF $\gamma$  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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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 [138].

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 [139]

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 [140]. La presencia de sTNF-R está estimulada por la acción de IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y disminuida por la IL-1.

## 8.4.- Métodos de detección de citocinas

Diversos avances tecnológicos permiten detectar y cuantificar las citocinas y facilitan su aplicación experimental y clínica. La actividad de las citocinas se puede determinar por diversos métodos:

1) **Técnicas de inmunoensayo como ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) que permiten cuantificar la concentración de citocinas en los fluidos biológicos.

2) **Citometría de flujo**, que permite identificar la presencia de citocinas intracelulares [141]

3) **Técnica PCR** (Polymerase Chain Reaction) o técnica de reacción en cadena de la polimerasa, método que detecta y cuantifica los niveles de mRNA que codifica una determinada citocina.

## 9.- Quimioterapia hipertérmica intrapleural

Basados en estas premisas se ha iniciado de forma paulatina el uso de quimioterapia hipertérmica intrapleural en el tratamiento de algunos procesos malignos que muestran un claro crecimiento loco-regional como ocurre en el caso de los mesoteliomas pleurales malignos y las neoplasias secundarias pleurales, lo que ha abierto nuevas vías al tratamiento de estos procesos [1,74].

En diversos estudios, el uso de quimioterapia hipertérmica intrapleural basada principalmente en la utilización de cisplatino, ha demostrado ser factible y de gran utilidad ya que consigue alcanzar elevadas concentraciones del citostático en la cavidad pleural con una moderada absorción sistémica [73]. Aunque su mecanismo de acción no está aún claramente definido [7], la hipertermia facilita la absorción del citostático y permite que penetre más fácilmente en el interior de las células mesoteliales malignas. En estas condiciones, el medicamento activa la destrucción celular a través de diversos mecanismos: alteración de la permeabilidad de la membrana celular, interacción en la síntesis del ADN, repercusión sobre la función del citoesqueleto y producción de apoptosis [6].

De acuerdo con esta premisa, en los últimos años, en pacientes diagnosticados de mesotelioma pleural maligno en estadio precoz se han realizado diferentes estudios [142,143] aplicando un tratamiento multimodal basado en resección quirúrgica del proceso tumoral y perfusión hipertérmica intrapleural con diversos quimioterápicos [1]. La aplicación de esta pauta de tratamiento permite una significativa mejoría de los resultados, con una tasa de supervivencia al año superior al 42% [142], y una morbimortalidad reducida [4].

Basado en los mismos hechos, se ha comenzado a tratar los derrames pleurales malignos mediante la administración hipertérmica intrapleural de citostáticos, principalmente adriamicina y cisplatino, al comprobar que esta terapia incrementa también la tasa de apoptosis celular en estos procesos [79]. El método de aplicación se ha simplificado paulatinamente propugnando hoy día las técnicas de cirugía mínimamente invasiva [144]

No obstante, no existe consenso en los diversos estudios publicados sobre el tipo de citostático a utilizar, la dosis óptima, la temperatura de aplicación y el tiempo de perfusión.

Así, en el tratamiento del mesotelioma pleural maligno y tras realizar una cirugía citorreductora, de Bree et al. [143] aplican una perfusión intrapleural durante 90 minutos de adriamicina a dosis de 15 a 25 mg/m<sup>2</sup> y cisplatino a dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> a temperatura de 40 a 41 °C, consiguiendo control local de la enfermedad durante un periodo medio de 7 meses, en 7 de 11 pacientes tratados. Van Ruth et al. [1], en pacientes con mesotelioma pleural maligno en estadio I tratados con cirugía citorreductora, aplican perfusión quimioterápica intrapleural (cisplatino a dosis fija de 80 mg/m<sup>2</sup> y doxorubicina con dosis inicial de 20 mg/m<sup>2</sup> e incrementos progresivos de 5 mg/m<sup>2</sup>) a temperatura de 40 °C durante 90 minutos, obteniendo en los 20 pacientes tratados supervivencia media de 11 meses.

Por otra parte, en los derrames pleurales malignos por cáncer de pulmón Shigemura et al. [144] utilizan a través de un abordaje por cirugía videoasistida, una perfusión de cisplatino a dosis de 200 mg/m<sup>2</sup> a una temperatura de 42 °C durante una o dos horas. Consiguen dosis de citostático en pleura de 20 a 40 veces superiores a las determinadas en plasma y demuestran que usar la perfusión durante más de una hora no influye en la supervivencia media. Refaely et al. [145], en pacientes diagnosticados de timoma con derrame pleural maligno,

utilizan, tras la resección quirúrgica, perfusión intrapleural de cisplatino a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> durante una hora con un flujo de 1 a 2 litros/minuto a temperatura de 40 a 43 °C, obteniendo buen control local de la enfermedad.

La disparidad mostrada en el método de aplicación y los resultados hace necesaria la realización de estudios para determinar de forma fehaciente las características específicas de las células mesoteliales, su termosensibilidad, sus reacciones y la respuesta al calor y a los quimioterápicos, tanto de las células normales como de las neoplásicas.

En un reciente estudio [79] se muestran los resultados en un grupo de 11 pacientes con adenocarcinoma primitivo pulmonar con derrame pleural maligno y sin metástasis a distancia, a los que se realizó, tras la resección quirúrgica, una perfusión de la cavidad pleural con una solución salina conteniendo 200 mg/m<sup>2</sup> de cisplatino a 43 °C durante 2 horas. Utilizando técnicas inmunocitoquímicas se determinó el índice de apoptosis que presentaban las células del derrame pleural maligno antes y después de 24 horas tras la perfusión hipertérmica intrapleural. El porcentaje de células con tinción positiva que presentaban apoptosis espontánea antes de la perfusión era del 2,8% pasando a ser del 25,2% en las células recogidas 24 horas después de la perfusión. Estas células presentaban importantes alteraciones estructurales con edema celular y presencia de vacuolas intracelulares no presentes en células normales. La media de supervivencia de los pacientes tratados con perfusión hipertérmica fue de 20 meses frente a los 6 meses de los pacientes del grupo control.

Profundizando en los mecanismos de producción de estos hechos, Smythe et al. [7] han estudiado las alteraciones de la expresión de la familia de proteínas Bcl-2, comprobando que la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak está intacta en las células del mesotelioma, pero sólo una proteína antiapoptótica, la Bcl-XL, se encuentra expresada en niveles altos en estas células.

Estos hallazgos y los derivados del estudio de las señales celulares mediante las que la hipertermia y la quimioterapia puedan influir en el comportamiento celular, hacen necesario intentar conocer con más detalle los mecanismos que modulan la apoptosis y la necrosis de las células mesoteliales tanto normales como neoplásicas.

## **B.- Hipótesis de trabajo**

Teniendo en cuenta el planteamiento del tema y los logros y controversias derivados del estudio y aplicación de la quimioterapia intrapleural hipertérmica, este proyecto, 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.

## **C.- Material y métodos**

## **1.- Instrumentación**

### **1.1.- Laboratorio de Cirugía Experimental**

**Quirófano de Cirugía Experimental** de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. Está dotado de todos los medios necesarios para la realización de intervenciones quirúrgicas en animales de experimentación.

**Material fungible** necesario para realizar las experiencias planteadas de acuerdo con lo expuesto en el apartado de diseño experimental.

**Animalario homologado** de acuerdo con las normas de la Unión Europea, supervisado por el Veterinario Oficial de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

**Cumplimiento de la normativa sobre protección de los animales utilizados** para la experimentación. Real Decreto 223/1998, Boletín Oficial del Estado (BOE) 18 de marzo de 1998 y Real Orden (R.O.) de 13 de octubre de 1989 (BOE, 18 de octubre). Real Decreto 1201/2005, 10 de octubre de 2005, sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

## **1.2.- Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**

Dispone de la dotación técnica necesaria para la realización de cultivos celulares (Fig. 8).

Medios para la realización de análisis múltiples de expresión celular de proteínas proinflamatorias.

Citometría de flujo y medios complementarios para investigar la producción de apoptosis y necrosis celular.

Material fungible necesario para la realización de las técnicas expuestas en el apartado de diseño experimental.

Realización de técnicas de análisis para la determinación de citocinas utilizando el *kit* de RayBiotech para la detección simultánea de niveles de múltiples citocinas desde el medio de cultivo (Fig. 9). Utilización para la cuantificación del software Quantity One ® de los laboratorios BioRad.

Determinación de la apoptosis celular mediante detección en la superficie de la célula de fosfatidilserina con la Anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) mediante el *kit* de detección de apoptosis de Pharmingen, para detectar apoptosis, y con tinción vital de Ioduro de Propidio para determinar necrosis.

Análisis de las muestras utilizando el FACScan (Fig. 10) y el programa Cellquest (Becton Dickinson).

## **2.- Diseño experimental**

### **2.1.- 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 223/1998, BOE 18 de marzo de 1998 y R.O. de 13 de Octubre de 1989 (BOE, 18 de Octubre). Real Decreto 1201/2005, 10 de octubre de 2005).

### **2.2.- Obtención de las células pleurales**

#### **2.2.1.- Procedimiento anestésico**

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 (Fig. 11).

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.

### **2.2.2.- Procedimiento quirúrgico y obtención de las células pleurales**

Incisión cutánea de esternolaparotomía media (Fig. 12). Apertura de la línea media abdominal y del peritoneo parietal.

Visualización y comprobación de la integridad de ambos hemidiafragmas (Fig. 13).

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 (Fig. 14).

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; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1,44 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l) (Fig. 15).

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.

### **2.3.- Transporte de las muestras. Restricciones de aceptación por el laboratorio**

Transporte al Laboratorio de Biología y Genética Molecular del líquido pleural y su sobrenadante celular en condiciones térmicas de 4 °C.

La contaminación pleural con sangre tras la técnica quirúrgica podría inducir variación de los niveles de citocinas en el sobrenadante del líquido pleural con la posibilidad de obtención de falsos positivos.

Para evitar esta contaminación, las condiciones y el procedimiento de obtención de las células mesoteliales de la cavidad pleural fueron optimizados. De este modo, la estanqueidad hemática de la cavidad pleural resultó prácticamente semejante a la que se hubiera derivado de la exanguinación previa de los animales. No obstante, tras el análisis inicial por el laboratorio, se eliminaron del estudio las muestras con contaminación hemática o microbiana demostradas.

### **3.- Determinaciones en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular**

#### **3.1.- Recogida de células mesoteliales y macrófagos pleurales**

Las células pleurales (Fig. 16) 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 µgr/ml de estreptomina, 50 µgr/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 10<sup>6</sup> células, suficientes para garantizar en cada experiencia la fiabilidad de los resultados de las distintas determinaciones.

### **3.2.- Establecimiento de grupos experimentales de estudio**

Basal: cultivo de células mesoteliales en condiciones normotérmicas (37 °C) sin modificación farmacológica.

Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 40 °C durante 120 minutos.

Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 42 °C durante 120 minutos.

Cultivo de células mesoteliales en condiciones normotérmicas (37 °C), sometidas a tratamiento citostático con cisplatino\* durante 120 minutos.

Cultivo de células mesoteliales sometidas a choque térmico de 40 °C y tratamiento citostático con cisplatino\* durante 120 minutos.

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.

### **3.3.- 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).

#### **3.3.1.- Estudio de liberación de proteínas proinflamatorias**

##### **3.3.1.1.- Elección del sistema de determinación**

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 (Fig. 17). Estos *arrays* contienen, entre otras, las proteínas que inicialmente presentan más relevancia fisiopatológica.

### **3.3.1.2.- Metodología**

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.

### **3.3.1.3.- Detección de señales. Análisis de datos y gráficas**

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 (Fig. 18) 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.

### **3.3.2.- Estudio de la apoptosis y la necrosis celular**

Protocolo de determinación de la apoptosis y la necrosis celular, mediante tinción con Anexina V-FITC y Ioduro de Propidio

#### **3.3.2.1.- Soluciones empleadas**

10x Binding Buffer (0,1M HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 25 mM CaCl<sub>2</sub>). 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; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1,44 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l). pH ajustado a 7,2. Autoclave.

#### **3.3.2.2.- Metodología**

Las células recolectadas se lavaron dos veces en PBS a 4 °C y se resuspendieron a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> 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).

#### **4.- 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.

## **D.- Resultados**

## 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%) (Gráfica 1).

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 (Gráfica 2).

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 (Gráfica 3).

En la gráfica 4 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 (Gráfica 5).

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 (Gráfica 6).

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 (Gráfica 7).

En la gráfica 8 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 9, 10 y 11.

## **2.- Determinación de la producción de apoptosis y necrosis celular**

### **2.1.- Análisis porcentual**

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 (Gráficas 12 y 13).

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 (Gráficas 14, 15 y 16):

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 17, 18 y 19.

## **2.2.- Dinámica de expresión**

### **2.2.1.- Expresión de Anexina V-FITC (células en apoptosis)**

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 adicionalmente 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 20).

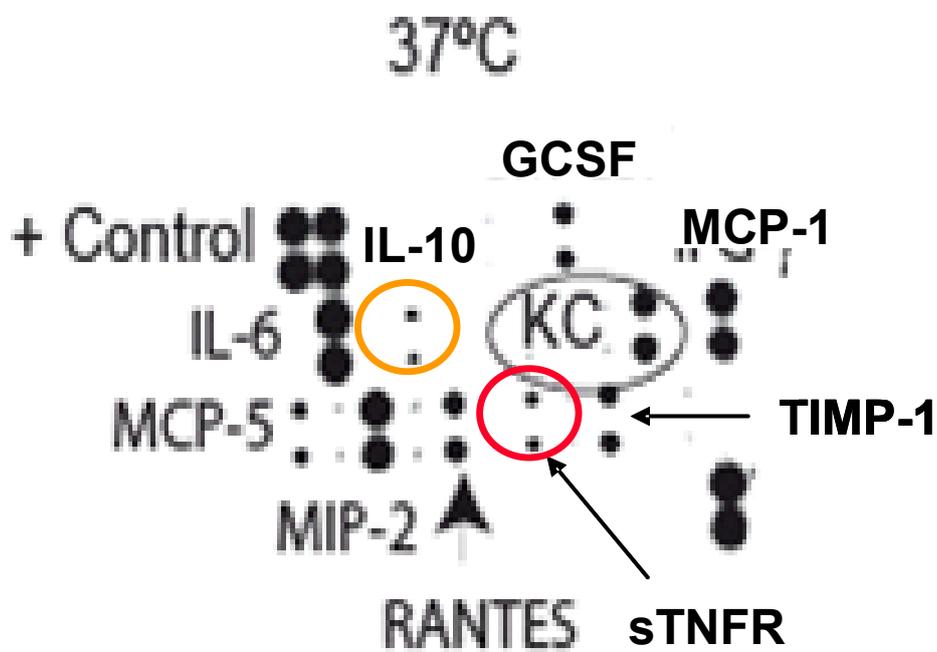
### **2.2.2.- Tinción con ioduro de propidio (necrosis celular)**

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.

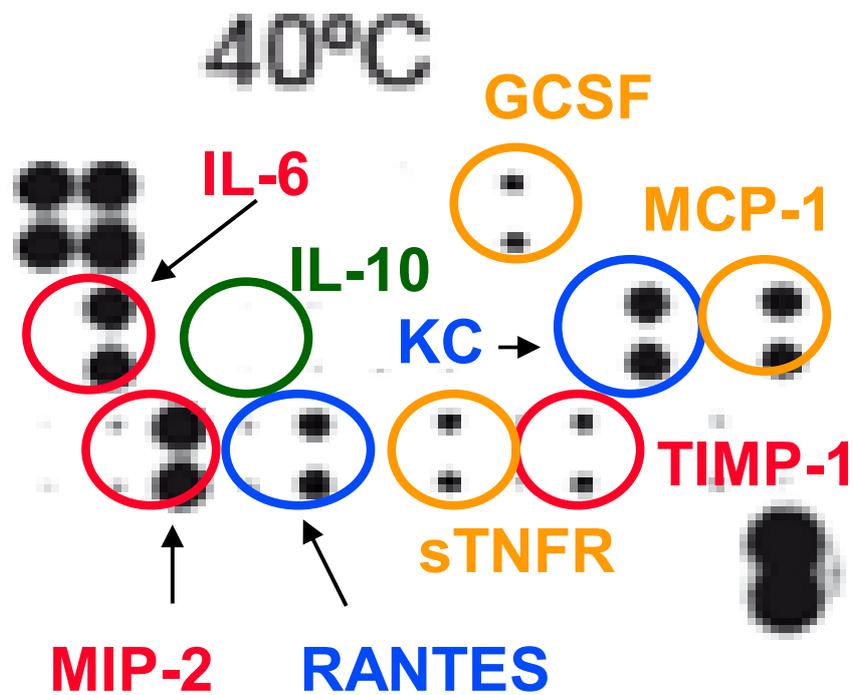
Producción en todos los casos de un desplazamiento hacia la derecha de la curva de fluorescencia, traductora de la expresión de producción de necrosis celular.

Incremento progresivo del registro del número de eventos con la elevación de la temperatura de 37 a 40 y a 42 °C (Gráfica 20).

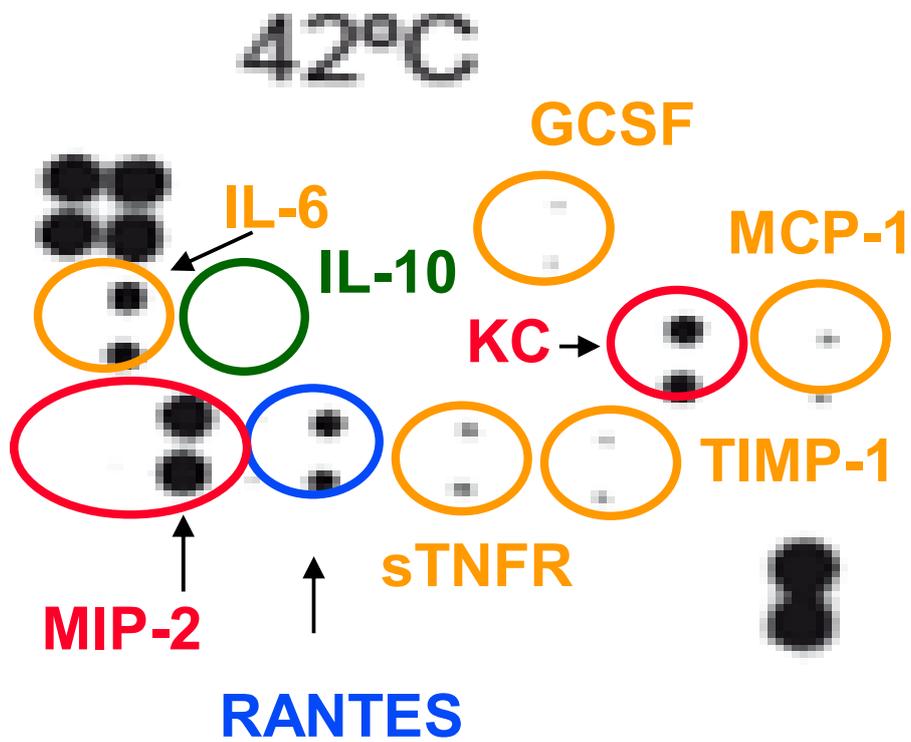
## **E.- Compendio de los resultados**



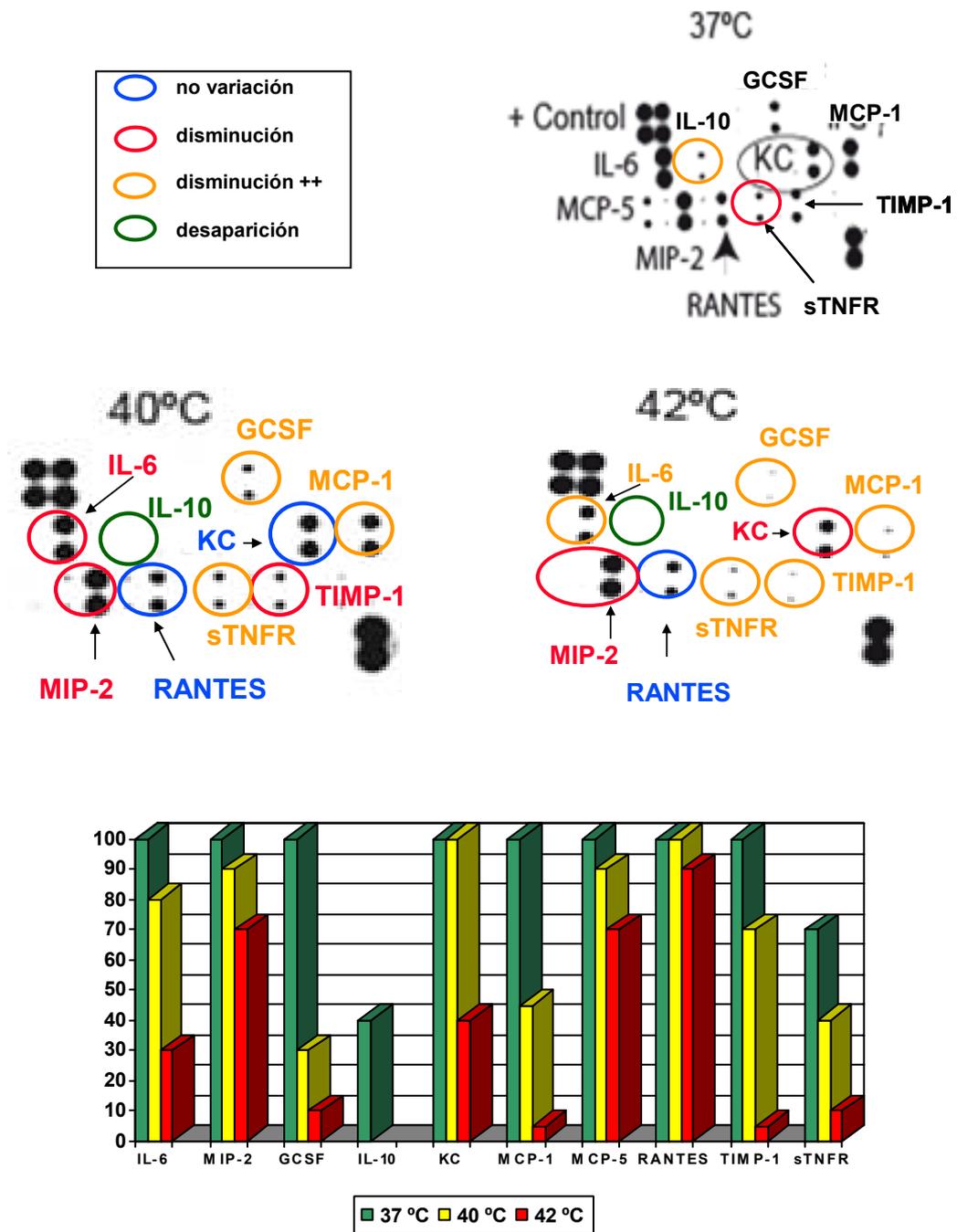
Gráfica 1: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura a 37 °C.



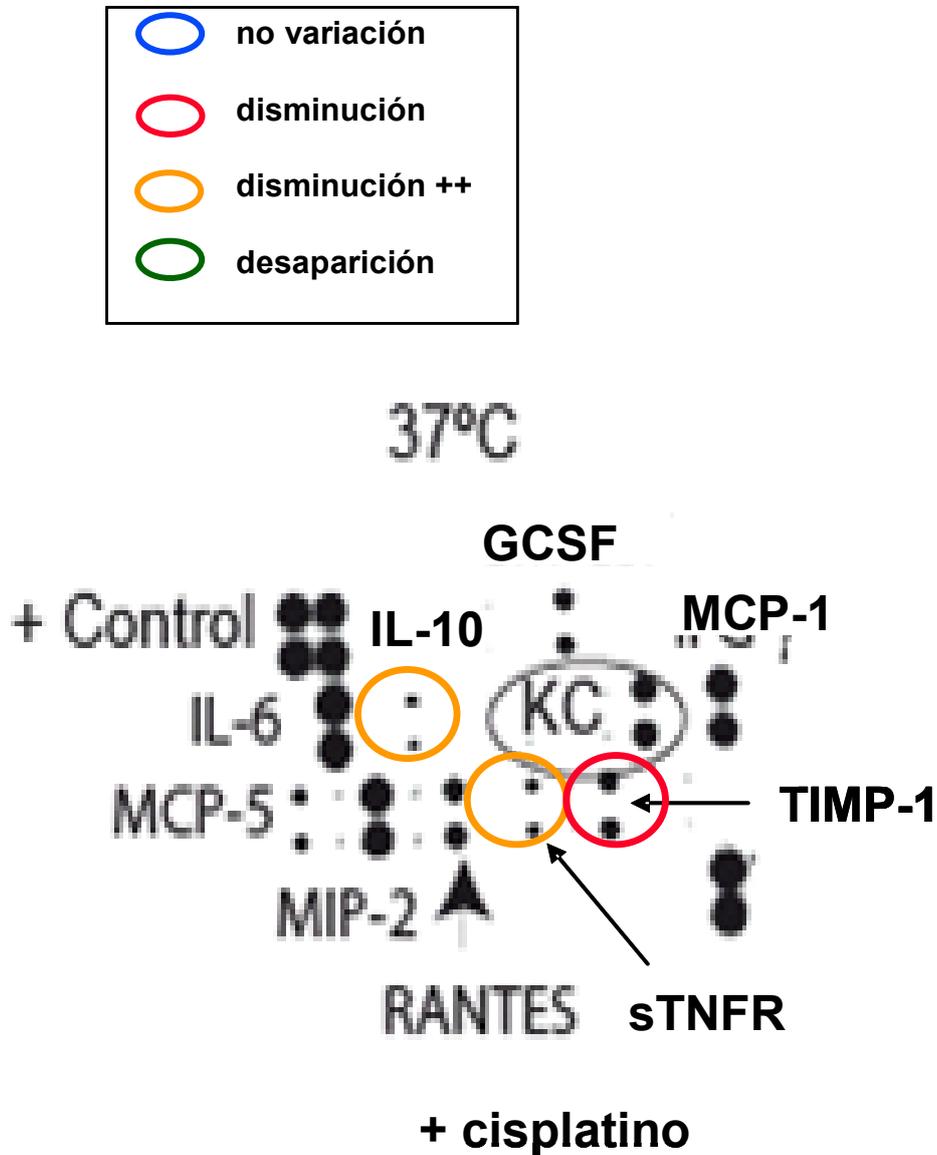
Gráfica 2: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura a 40 °C.



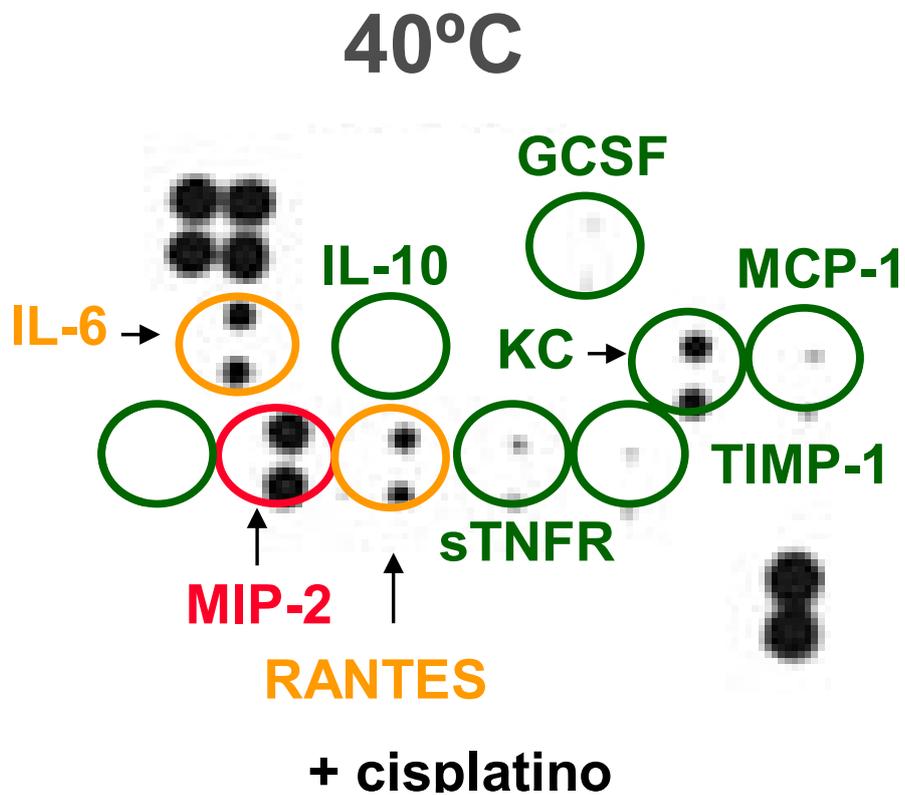
Gráfica 3: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura a 42 °C.



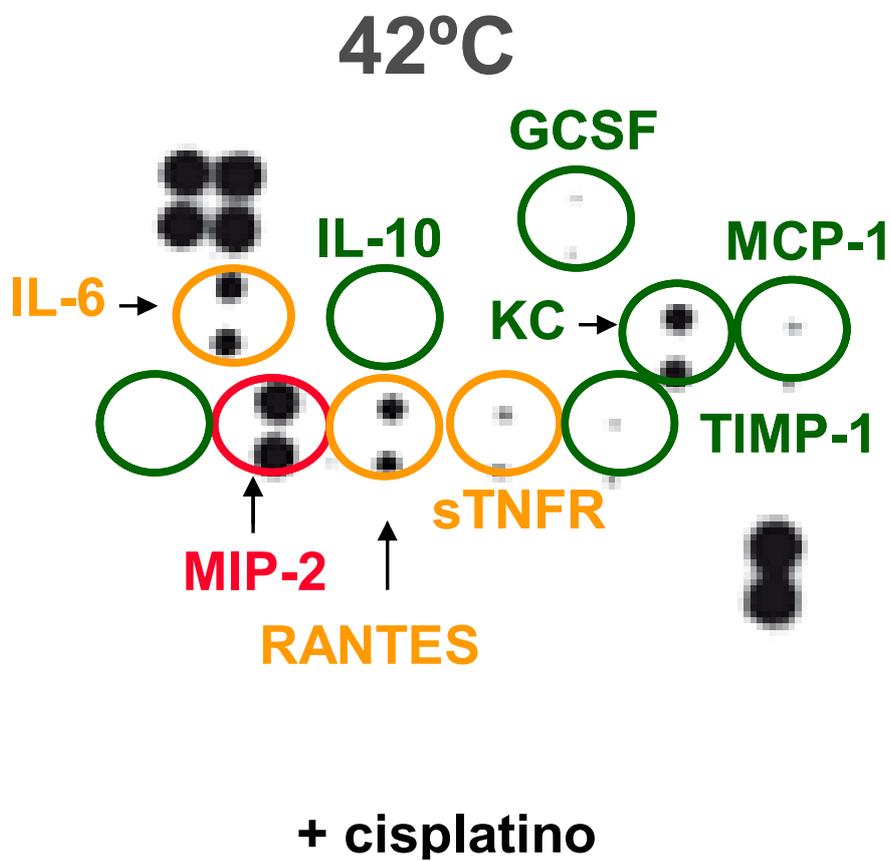
Gráfica 4: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C).



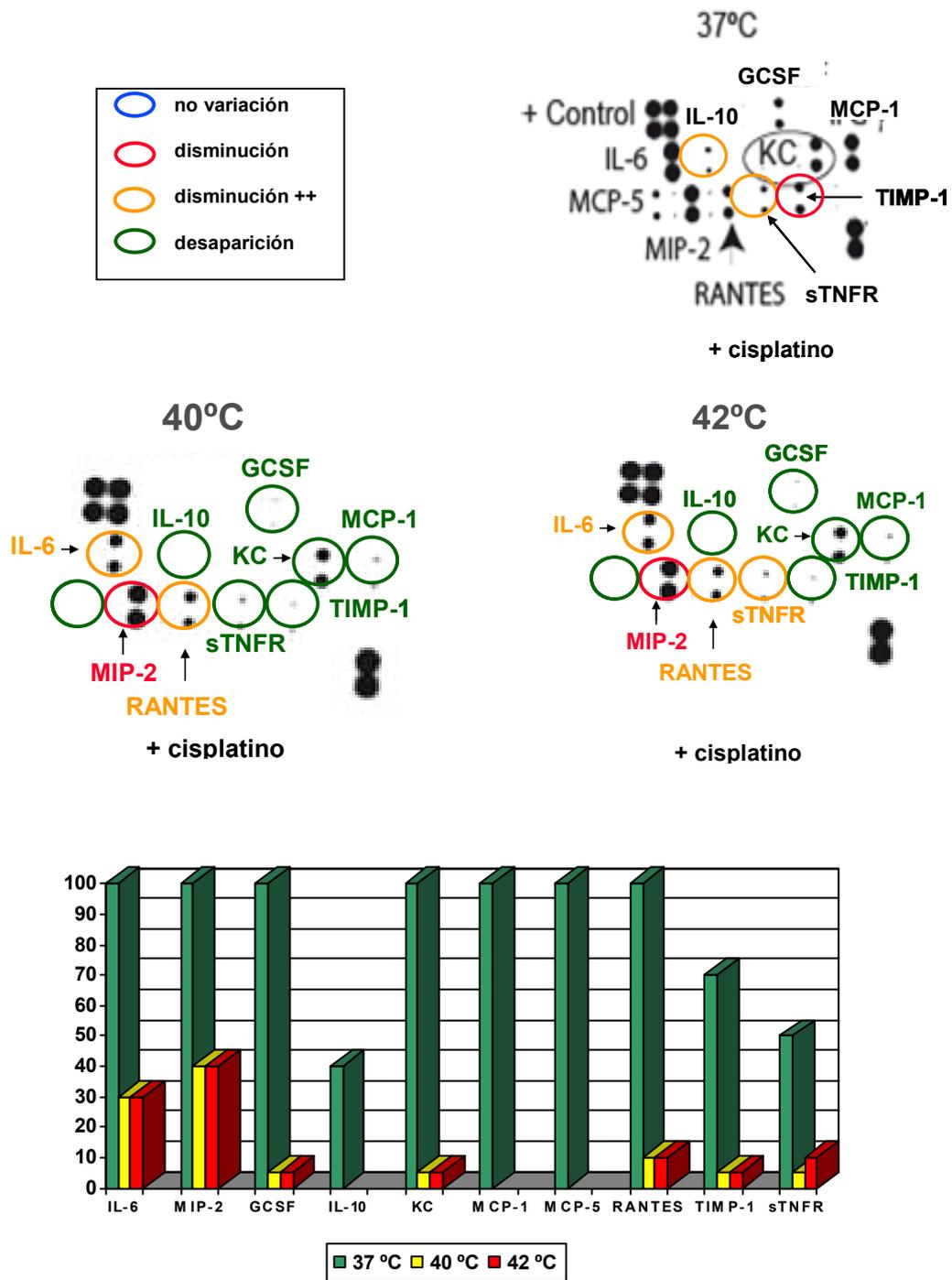
Gráfica 5: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura (37 °C) y la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).



Gráfica 6: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura (40 °C) y la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).



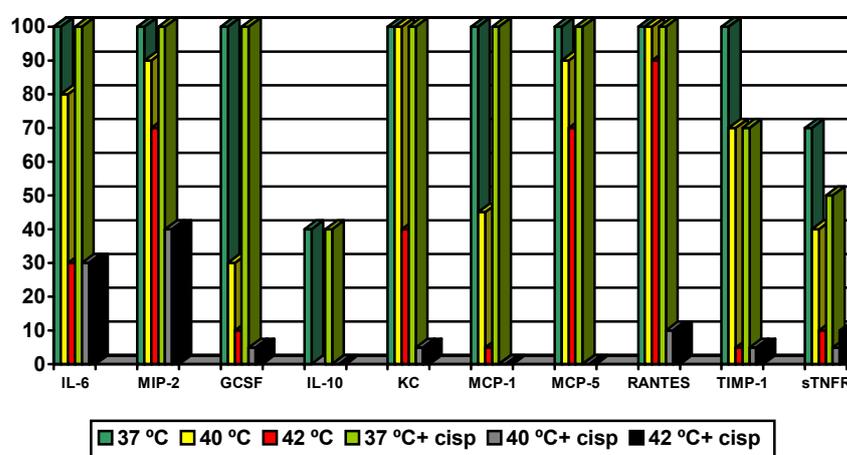
Gráfica 7: Expresión de citocinas en las células pleurales. Modulación por la temperatura (42 °C) y la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).



Gráfica 8: 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).

<b>Gráfica 9: Expresión de citocinas en las células pleurales (%). Modulación por la temperatura y el cisplatino</b>						
<b>Citocinas</b>	<b>Modulación térmica</b>			<b>Adición de cisplatino (33,7 µg/ml)</b>		
	<b>37 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>42 °C</b>	<b>37 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>42 °C</b>
<b>IL-6</b>	100	80	30	100	30	30
<b>MIP-2</b>	100	90	70	100	40	40
<b>G-CSF</b>	100	30	30	100	5	5
<b>IL-10</b>	40	--	--	40	--	--
<b>KC</b>	100	100	40	100	5	5
<b>MCP-1</b>	100	45	5	100	--	--
<b>MCP-5</b>	100	90	70	100	--	--
<b>RANTES</b>	100	100	90	100	10	10
<b>TIMP-1</b>	100	75	5	70	5	5
<b>sTNF-R</b>	70	40	10	50	5	10

Gráfica 9: Expresión de citocinas en las células pleurales (%). Modulación por la temperatura y el cisplatino.



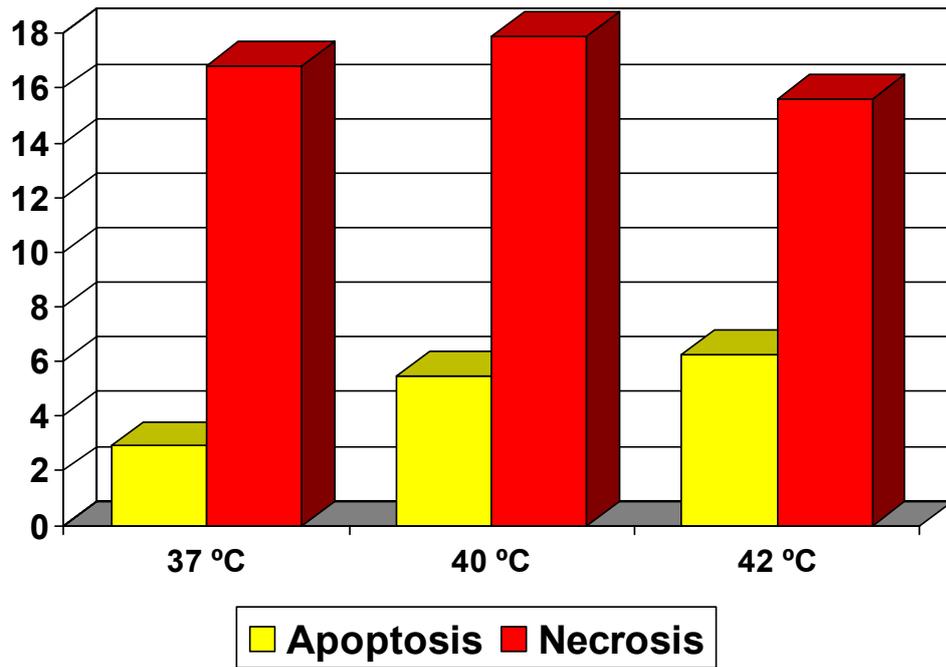
Gráfica 10: Expresión de citocinas en las células pleurales (%). Modulación por la temperatura (37, 40 y 42 °C), sin y con la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).

<b>Gráfica 11: Expresión de citocinas en las células pleurales (%). Modulación por la temperatura</b>							
<b>Temperatura</b>	<b>KC</b>	<b>RANTES</b>	<b>G-CSF</b>	<b>MIP-2</b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-10</b>	<b>sTNF-R</b>
<b>37 °C</b>	100	100	100	100	100	40	70
<b>40 °C</b>	100	100	30	90	80	--	40
<b>42 °C</b>	40	90	30	70	30	--	10
<b>p(37/42 °C)</b>	0,005	0,005	0,006	0,006	0,006	0,001	0,001

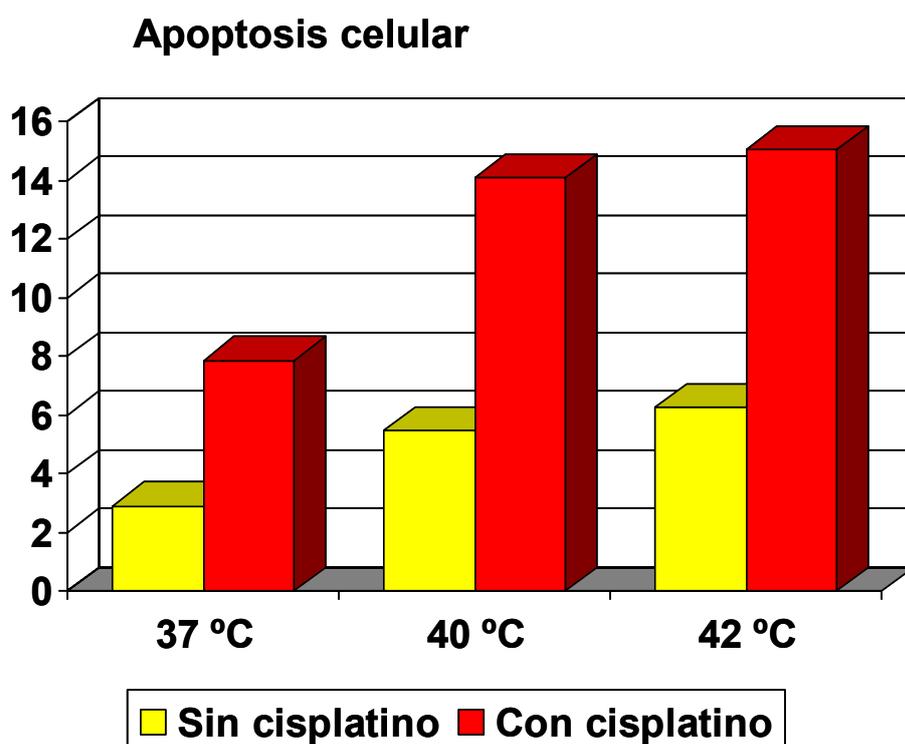
Gráfica 11: Expresión de citocinas en las células pleurales (%).  
Modulación por la temperatura.

<b>Gráfica 12: Apoptosis y necrosis de las células pleurales (%). Modulación por la temperatura</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Apoptosis</b>	<b>Necrosis</b>
<b>37 °C</b>	2,90	16,81
<b>40 °C</b>	5,46	17,90
<b>42 °C</b>	6,27	15,59

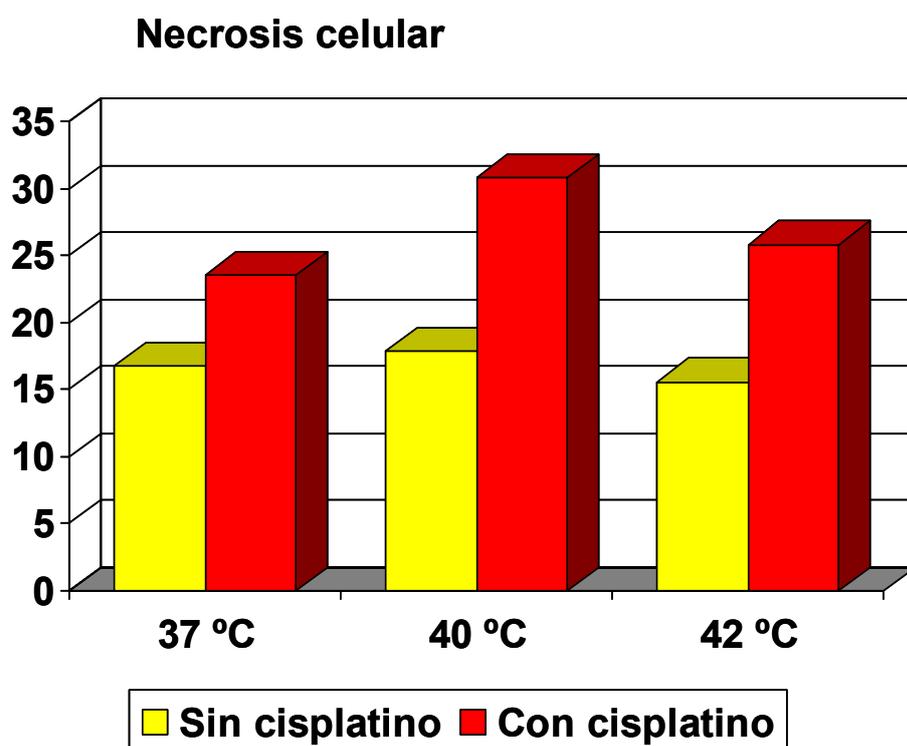
Gráfica 12: Porcentaje de apoptosis y necrosis de las células pleurales.  
Modulación por la temperatura.



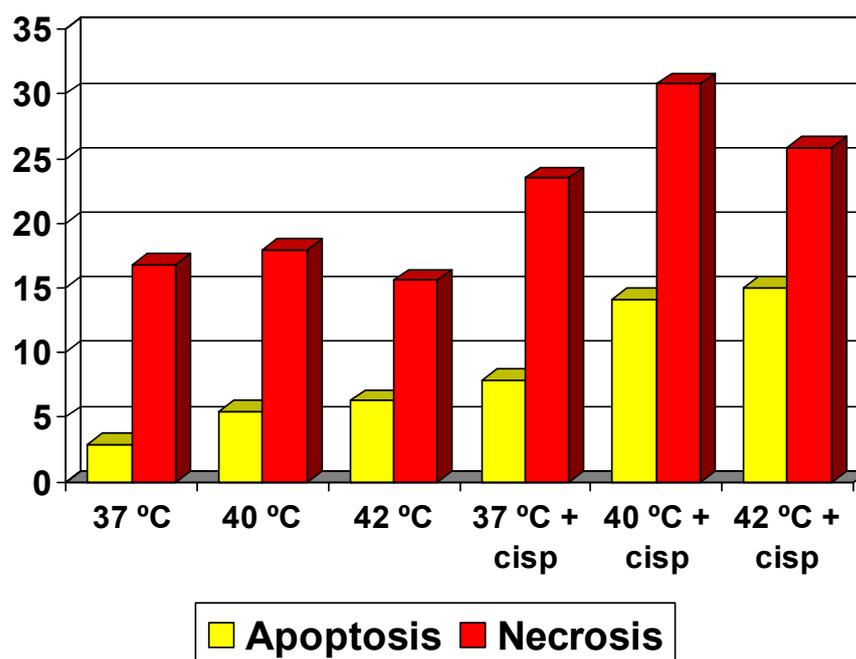
Gráfica 13: Porcentaje de células pleurales en apoptosis y necrosis en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C).



Gráfica 14: Porcentaje de células pleurales en apoptosis en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C), sin y con la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).



Gráfica 15: 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).



Gráfica 16: 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).

<b>Gráfica 17: Apoptosis de las células pleurales (%). Modulación por la temperatura y el cisplatino</b>				
<b>Temperatura</b>	<b>Apoptosis</b>	<b>Apoptosis</b>		
	<b>T</b>	<b>T+CP (33,7 µg/ml)</b>	<b>% Incremento</b>	<b>p</b>
<b>37 °C</b>	2,90	7,86	271	0,347
<b>40 °C</b>	5,46	14,10	258	0,117
<b>42 °C</b>	6,27	15,05	240	0,347

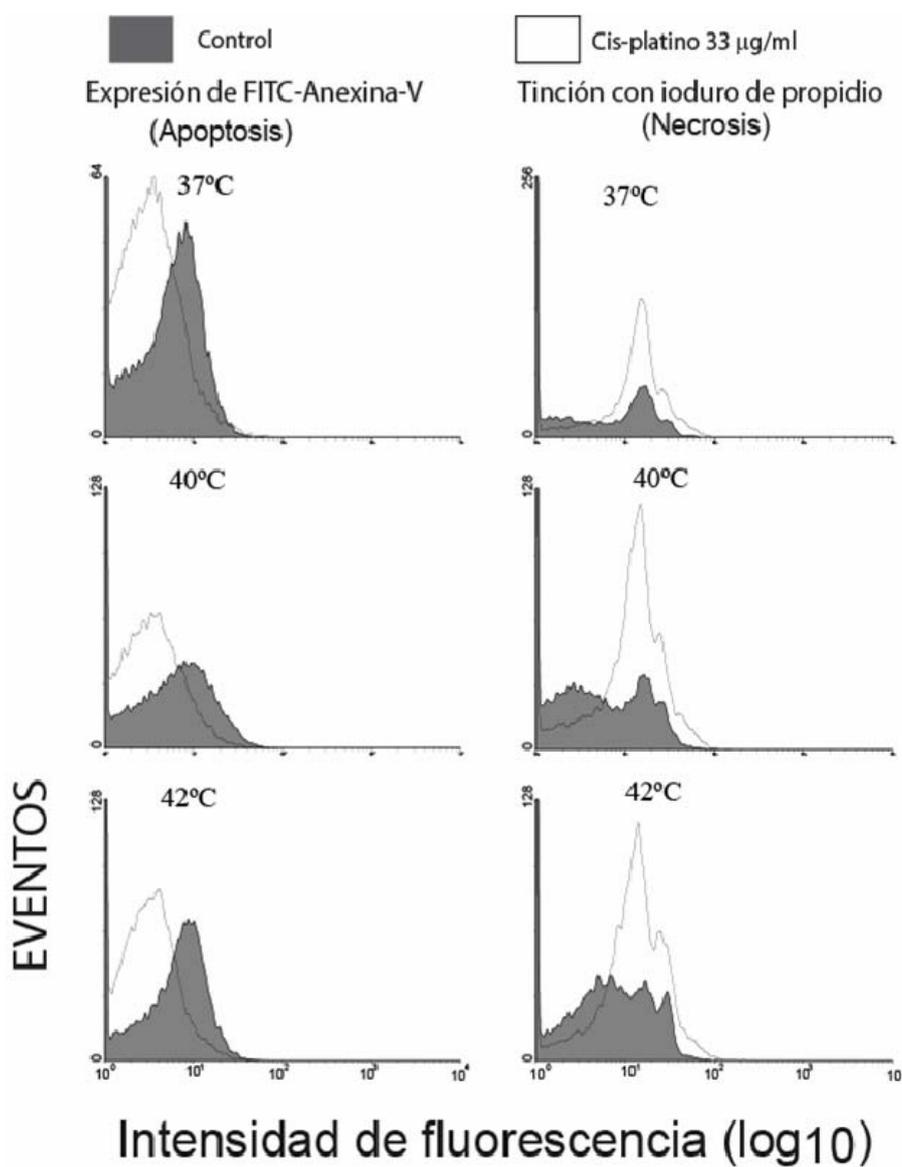
Gráfica 17: Porcentaje de células en apoptosis en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C) sin y con la adición de cisplatino (33,7 µg/ml).

<b>Gráfica 18: Necrosis de las células pleurales (%). Modulación por la temperatura y el cisplatino</b>				
<b>Temperatura</b>	<b>Necrosis</b>	<b>Necrosis</b>		
	<b>T</b>	<b>T+CP (33,7 µg/ml)</b>	<b>% Incremento</b>	<b>p</b>
<b>37 °C</b>	16,81	23,49	139	0,251
<b>40 °C</b>	17,90	30,77	172	0,117
<b>42 °C</b>	15,59	25,82	166	0,117

Gráfica 18: 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).

<b>Gráfica 19: Apoptosis y necrosis de las células pleurales (%). Modulación por la temperatura</b>		
<b>Temperatura</b>	<b>Apoptosis</b>	<b>Necrosis</b>
<b>37 °C</b>	2,90	16,81
<b>40 °C</b>	5,46	17,90
<b>42 °C</b>	6,27	15,59
<b>p(37/42 °C)</b>	0,041	0,762

Gráfica 19: Porcentaje de células pleurales en apoptosis y necrosis en las diferentes condiciones de temperatura (37, 40 y 42 °C).



Gráfica 20: 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).

## **F.- Discusión de los resultados**

## Discusión

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

Como prototipo de las neoplasias pleurales malignas, el mesotelioma pleural permanece como un tumor de difícil tratamiento y curación. La supervivencia a largo plazo se asocia principalmente con un diagnóstico precoz y un tratamiento agresivo a fin de cumplir objetivos concretos. Una correcta estadificación mediante mediastinoscopia, videotoracoscopia, RM y PET, la utilización de pruebas anatomopatológicas específicas, la experiencia en la práctica de pleurectomía o decorticación *versus* pleuroneumonectomía o neumonectomía extrapleural extendida y la administración de tratamiento adyuvante intra y/o postoperatorio, resultan necesarios.

Sin embargo, tan sólo una minoría de pacientes, los afectados de un mesotelioma en estadio inicial, pueden en principio ser tratados con potencial intención curativa. La puesta en práctica de un tratamiento multimodal que incluye cirugía radical, quimioterapia y radioterapia, intenta hacer posible su consecución [39,62,65,66].

La necesidad de conseguir tratamientos más efectivos está motivada por los hallazgos epidemiológicos del mesotelioma pleural maligno que predicen un incremento progresivo de su incidencia hasta el año 2020 [146]. Con este objetivo se han experimentado nuevas actuaciones terapéuticas que incorporan inmunoterapia específica e inespecífica, inmunoquimioterapia, terapia génica y utilización de inhibidores de la angiogénesis [147].

En los últimos años han sido estudiadas distintas modalidades de quimioterapia sistémica y loco-regional, incluyendo quimioterapia intrapleural hipertérmica. En pacientes con mesotelioma en estadio inicial, la hipertermia intrapleural combinada con quimioterapia parece ser una opción terapéutica razonable [73,74]. Así mismo, un posible beneficio ha sido observado tras su aplicación en pacientes con enfermedad localmente avanzada y posibilidades restringidas de tratamiento quirúrgico [142,148]. No obstante, y a semejanza de lo que ocurre con otras nuevas técnicas, su mecanismo de acción para lograr destruir las células neoplásicas debería ser más investigado y los resultados obtenidos, razonablemente aplicados al desarrollo de nuevos protocolos terapéuticos [149].

Un factor responsable y que contribuye de forma determinante en la pobre respuesta que el mesotelioma presenta a los tratamientos habituales es su resistencia a la apoptosis, una de las características principales y específicas de los procesos neoplásicos [150].

Como hemos indicado previamente la apoptosis celular puede desarrollarse por dos mecanismos, la vía extrínseca o de los receptores de muerte de membrana, inducida por los miembros de la familia de genes del receptor TNF (Tumor Necrosis Factor), y la vía intrínseca o mitocondrial que produce la destrucción de la célula por daño del ADN y que está regulada por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2, entre los que podemos diferenciar dos grupos, las proteínas proapoptóticas (Bid, Bad, Bim, Bik, Bax y Bak) y las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w y Mcl-1). El mecanismo exacto por el que este grupo de proteínas actúa sobre la célula e inducen o previenen su destrucción es aún discutido, pero se piensa que Bcl-2 y Bcl-XL realizan sus efectos antiapoptóticos por estabilización del potencial de membrana mitocondrial e impidiendo la liberación de sustancias inductoras de la apoptosis como el citocromo c, AIF (Apoptosis-Inducing Factor) y Smac/Diablo (Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP-Binding Protein with Low pI).

Ambas vías están interconectadas mediante la actuación de algunas proteínas proapoptóticas. Así, tras la activación de los receptores de muerte de membrana (vía extrínseca) se induce la formación de DISC (Death-Inducing Signalling Complex) y la activación de la caspasa 8 que es capaz de activar la proteína proapoptótica Bid y estimular la salida desde la mitocondria del citocromo c, activándose de esta manera la vía intrínseca o de las caspasas.

En la mayoría de los tumores sólidos se ha demostrado la expresión de proteínas antiapoptóticas del tipo de Bcl-XL y Bcl-2 y en diversos estudios se ha comprobado la correlación entre la presencia de estas proteínas y la quimiorresistencia del tumor [151,152]. También se ha comprobado la presencia de niveles elevados de Bcl-XL en células mesoteliales y en biopsias de mesoteliomas [153].

Por otra parte, la reducción farmacológica de la expresión de Bcl-XL ha mostrado un incremento de la apoptosis tanto en las células mesoteliales normales como en los mesoteliomas pleurales malignos, mientras que niveles elevados de expresión de esta proteína mostraban la resistencia de este tumor a la inducción de apoptosis celular [154]. De acuerdo con estos resultados, la aplicación de medicamentos que modularan la actividad de estas proteínas y estimularan la apoptosis y la necrosis celular podrían ser útiles en el tratamiento del mesotelioma [155].

Actualmente se ha demostrado que todas las funciones celulares están controladas por diversos genes y mecanismos de señalización [8] entre los que destacan por su importancia las citocinas, sustancias de naturaleza proteica que intervienen en los mecanismos de apoptosis, angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular. En base a estos hechos, se han estudiado diversas proteínas proinflamatorias para determinar su influencia en la respuesta de las células mesoteliales frente a distintos agentes quimioterápicos [9].

La mayoría de las funciones celulares son realizadas por proteínas lo que aconseja el estudio de los niveles de expresión de estas proteínas para valorar más correctamente su actividad funcional [10]. La detección simultánea de distintas citocinas resulta muy interesante para su estudio, ya que a nivel celular las interacciones de estímulos positivos y negativos son complejas e implican frecuentemente a múltiples citocinas [11].

De acuerdo con lo expuesto, e intentando determinar la modulación y consecuencias de la reacción celular proinflamatoria inducida por los agentes terapéuticos hipertermia y quimioterapia intrapleural, resulta a nuestro juicio de interés establecer la relación entre el nivel de expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis celular. De este modo, el conocimiento de la dinámica de acción sobre las células mesoteliales de los agentes terapéuticos señalados podría ser mejorado.

## **2.- ¿Cuál es el modelo experimental idóneo para intentar dar respuesta al problema planteado? Idoneidad del procedimiento**

La mayoría de la investigación sobre procesos patológicos se realiza en un modelo experimental animal para posteriormente trasladar la dinámica experimental a un cultivo celular humano, intentando corroborar y ampliar los resultados y obtener conclusiones que permitan considerar la aplicación de dichos resultados de la investigación para su empleo específico en el hombre. De acuerdo con esta dinámica nuestro estudio, con planteamiento experimental y clara proyección hacia su ulterior aplicación clínica, obligó en primer lugar a la elección de un animal de experimentación idóneo para permitir realizar con éxito las distintas determinaciones planteadas.

El ratón común *Mus musculus*, es el animal más frecuentemente utilizado en la experimentación debido a su corto periodo gestacional, abundancia de crías y fácil manejo en el laboratorio. Además, la secuencia del genoma del ratón es un instrumento informativo clave para entender el contenido del genoma humano. La utilización en experimentación de este animal se basa, en parte, en la gran similitud que su genoma guarda con el del hombre, convirtiéndole en una herramienta básica en investigación terapéutica [156].

El estudio comparado del genoma humano y del ratón demuestra la presencia de una gran similitud de genes que codifican diversas proteínas relacionadas principalmente con la reproducción y la inmunidad [157]. El análisis taxonómico de las proteínas del ratón revela que menos del 1% de esas proteínas son específicas de la especie, mientras que el 99% de ellas son compartidas con otros grupos de mamíferos siendo similares en el 98% a las del ser humano [158].

El hecho de que el genoma de ambas especies esté tan estrechamente relacionado permite estudiar la evolución de las proteínas ortólogas o equivalentes entre el humano y el ratón. En su genoma, *Mus musculus*, presenta un 80% de genes equivalentes a los del humano con una homología que oscila del 70% al 100%. Además, el 70% de los aminoácidos de cada proteína es idéntico en el hombre que en el ratón y la secuencia de estos aminoácidos es coincidente en cada proteína en más del 78% [157].

Aunque en estudios recientes parece demostrarse que la coincidencia entre la expresión de proteínas de ambas especies es algo menor [159], en conjunto se puede afirmar que el 80% de las proteínas de *Mus musculus* presentan una similitud superior al 70% en sus equivalentes proteicos en el hombre, lo que hace que el ratón de laboratorio sea el modelo ideal para el estudio de un gran número de patologías humanas. La similitud viene dada por las secuencias proteicas conservadas entre las diferentes especies, siendo éste el factor más importante en investigación animal.

Si dos proteínas tienen una secuencia muy similar y una localización adecuada es probable que realicen una función muy parecida, por lo que si en ratones podemos modificar el comportamiento de una proteína podremos hacer lo mismo con su homóloga en humanos. Esta es la base de la investigación animal con fines terapéuticos, simular enfermedades en animales para conocer sus mecanismos de acción e intentar detener su avance mediante algún tratamiento farmacológico, genético o de cualquier otra índole. Si se consigue controlar una enfermedad en un organismo "sencillo" pero casi idéntico a nosotros, en lo que a genotipo se refiere, se podrá pasar a la fase de experimentación con tejidos humanos y ensayos clínicos. El experimento estará avalado por su eficacia en un organismo con una equivalencia con el hombre superior al 90%.

En nuestro caso, la utilización de un modelo experimental murino ha permitido realizar el estudio tanto de la expresión de proteínas proinflamatorias como de la determinación de la apoptosis y la necrosis de las células mesoteliales en distintas condiciones de temperatura y la electiva modificación de las condiciones de la muestra mediante la adición o no de un medicamento antitumoral.

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

Durante las últimas décadas, diversos estudios [160] han comprobado que la hipertermia puede utilizarse como un potente agente adyuvante de los quimioterápicos ya que actúa sinérgicamente con una gran variedad de drogas antineoplásicas potenciando su actividad antitumoral y reduciendo la resistencia del tumor al efecto del medicamento. El calor interacciona con estas drogas por varios mecanismos, principalmente incrementando la permeabilidad de la membrana celular, inhibiendo los mecanismos de reparación celular y potenciando el efecto antitumoral del medicamento [161]. No obstante, la aplicación del citostático en condiciones de hipertermia debe ser adecuadamente evaluada ya que ciertas drogas incrementan de forma peligrosa su citotoxicidad incluso a temperaturas de 39 a 41 °C [162] por lo que debería siempre utilizarse el medicamento que aporte los mejores resultados antitumorales con menos efectos adversos.

La combinación de calor y drogas antineoplásicas produce un incremento de la citotoxicidad por encima del efecto aditivo previsto, pero cada citostático presenta una forma peculiar de actuación, aunque habitualmente su actividad antineoplásica se incrementa de forma progresiva a medida que se eleva la temperatura.

Así, en estudios *in vitro*, se ha comprobado que cuando se utilizan thiotepa, nitrosoureas (bicloroetilnitrosourea y cloroetilciclohexilnitrosourea) y cisplatino, el porcentaje de inactivación celular es prácticamente proporcional cuando se realiza un incremento progresivo de la temperatura de 39 a 43 °C [162]. En cambio, doxorubicina, bleomicina y anfotericina B requieren temperaturas de 42 a 43 °C para que su acción sinérgica con la temperatura tenga lugar. En los estudios en los que se ha evaluado la modificación del efecto

del medicamento con el incremento progresivo de la temperatura, se ha comprobado que las nitrosoureas y el cisplatino alcanzan su respuesta óptima cuando se aplican calor y medicamento de forma simultánea [162,163].

En estudios *in vivo* en conejos con carcinoma se ha comprobado que un agente antimetabolito como el metotrexate, aplicado en condiciones de hipertermia a 42 °C no presenta incremento de su actividad sobre la expresada tras su aplicación a temperatura normal [164]. Sin embargo, agentes alquilantes como ciclofosfamida, mecloretamina y metilendimetano-sulfonato actúan de forma sinérgica con el calor potenciando su actividad antitumoral con el incremento de la temperatura. No obstante, debe valorarse la cronología de aplicación ya que determinadas drogas como la ciclofosfamida presentan una actividad sinérgica con la temperatura hasta los 44 °C, pero por encima de 5 horas de actuación disminuye su efectividad e incluso puede producir edema y necrosis de la piel en roedores [165]. Se ha demostrado también que las nitrosoureas presentan su mayor actividad en ratones cuando se aplican de forma simultánea el medicamento y el calor [166]. Los antibióticos antineoplásicos como doxorubicina, bleomicina y anfotericina B presentan potenciación de su actividad de forma independiente con el incremento de la dosis y la elevación de la temperatura, pero su actividad no siempre es sinérgica y los efectos secundarios son mayores cuando se aplican de forma simultánea, que aplicando ambos agentes por separado. Los efectos de dosis clínicamente tolerables de doxorubicina son aditivos, pero no se potencian con la aplicación de calor [166]. Se ha comprobado que la citotoxicidad de la bleomicina en los ratones está también potenciada por la elevación de la temperatura [167]. En la aplicación de cisplatino *in vivo*, se demuestra que actúa de forma similar a cuando se aplica *in vitro*, presentando un incremento progresivo de su actividad a medida que se eleva la temperatura. Estas características hacen que el cisplatino sea la droga más adecuada para el estudio de los efectos sinérgicos del calor y los citostáticos sobre las células en experimentación animal tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, en estudios experimentales 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, como el p53, Bcl-2 y Bax [109]. También se ha comprobado que el calor induce alteraciones en el entorno del tumor que provocan que las células neoplásicas se sensibilicen al efecto de ciertas drogas citotóxicas, principalmente cuando estas terapias se aplican a temperaturas de 39 a 43 °C, tanto en cultivos celulares como en experimentos con animales [106]. En estos casos, la determinación de la expresión de proteínas de choque térmico y de la apoptosis celular ha demostrado su utilidad para cuantificar el daño celular provocado por la acción del calor y los agentes antineoplásicos [79].

Adicionalmente 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 [108]. La base farmacológica que justifica esta respuesta celular podría concretarse según Sugarbaker et al. [110], en que el calor permite que el citostático penetre más fácilmente en el interior de las células facilitando la activación de la apoptosis tanto por la vía extrínseca como por la vía intrínseca, y provocando la necrosis de la célula tumoral.

En los últimos años, diversos estudios han propuesto la utilización de quimioterápicos por vía intracavitaria (intrapleural e intraperitoneal) [4], principalmente adriamicina y cisplatino, para el tratamiento de procesos neoplásicos con desarrollo loco-regional. En pacientes con mesotelioma pleural maligno la aplicación de quimioterapia intrapleural, utilizando principalmente cisplatino, muestra una importante respuesta farmacocinética y satisfactorios resultados en el control de la neoplasia, evitando los efectos indeseables de la QT sistémica y logrando mejorar discretamente las tasas de supervivencia [73].

Los buenos resultados obtenidos con el uso de cisplatino en la mayoría de los protocolos de tratamiento del mesotelioma [4], su tolerable absorción sistémica [5] y el hecho de que el cisplatino active la producción de especies reactivas de oxígeno que sensibilizan a las células para que sean susceptibles a los estímulos apoptóticos, nos indujeron a utilizar en nuestro modelo experimental el cisplatino como medicamento antitumoral.

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

Las células son sensibles al calor y someterlas a una elevada temperatura produce alteraciones que pueden provocar su destrucción. Diversos estudios han demostrado que el aumento de calor por encima de los 40 °C produce alteraciones celulares [105] con modificaciones citoestructurales, incremento de la actividad metabólica, desestabilización de las macromoléculas intracelulares y pérdida de su actividad biológica. La hipertermia actúa principalmente aumentando la permeabilidad de las membranas [6], con alteración de la actividad mitocondrial y destrucción de las uniones intermembranosas, provocando con temperaturas elevadas, por encima de los 44 °C, la destrucción celular por cauterización.

Los efectos de la elevación de la temperatura en la fisiología celular están directamente relacionados con la dosis de calor [104] y la termosensibilidad o respuesta que las células presentan al aumento de temperatura [168]. Por otra parte, la sensibilidad al calor es mayor en las células neoplásicas y en las que se encuentran en hipoxia o en fase de mitosis [103,104] por lo que resulta necesario determinar la termosensibilidad de cada célula tanto normal como tumoral y evaluar la proporción de células que sobreviven a una temperatura determinada [80].

El aumento de la temperatura a 40 °C produce en las células mesoteliales una alteración en la disposición de los fosfolípidos de la membrana celular con pérdida de su simetría y cambios en la disposición de la fosfatidilserina que pasa a situarse en la cara externa de la membrana citoplasmática permitiendo que la célula sea detectada y eliminada por los macrófagos. A esta misma temperatura se produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial con liberación del citocromo c desde el interior de la mitocondria al citoplasma,

activación de Bid e inducción de la apoptosis por la vía Fas mediada por caspasas [111].

La elevación de la temperatura a 42 °C provoca la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria, la activación de las caspasas 3 y 8 y una elevación significativa en la externalización de Fas [112]. A esta misma temperatura también se produce un incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  con disminución de los niveles de HSP 70 y fosforilización de proteínas de choque térmico que disminuyen el potencial de membrana de la mitocondria y permiten la liberación al citoplasma de factores desencadenantes de la apoptosis [113].

Por otra parte, la hipertermia, aislada o en combinación con otros factores, es capaz de inducir la muerte celular por fragmentación del ADN y activación de la apoptosis o la necrosis [111,112]. La actuación sinérgica de hipertermia junto con RT y QT aplicadas a las células tumorales provoca cambios en la expresión de los genes reguladores de la apoptosis, principalmente p53, Bcl-2 y Bax, que influyen significativamente en la muerte celular [109].

En diversos estudios en cultivos celulares se ha podido comprobar que la aplicación de calor con temperaturas superiores a los 43 °C induce la muerte de las células [106]. Por otra parte, la adición de cisplatino a esta misma temperatura durante cortos periodos de tiempo ha demostrado una actuación sinérgica [162], pero la elevación de la temperatura hasta niveles subletales (por encima de 43 °C) o la prolongación en el tiempo de aplicación del citostático provocaban la resistencia del tumor al efecto de ambos agentes [160].

Además, la hipertermia mantenida durante más de cinco horas después de la aplicación de cisplatino es menos efectiva que cuando se aplican cisplatino e hipertermia de forma simultánea [165].

Se ha comprobado que el tiempo de duplicación tumoral de diversos procesos neoplásicos en el ratón se reduce de forma significativa tras la aplicación de dos o tres pautas de tratamiento de cisplatino e hipertermia a 43 °C aplicados de forma simultánea durante periodos de 30 minutos [166,167].

En un estudio cooperativo en pacientes con diversos tipos de tumores en estadio avanzado, encaminado a determinar la respuesta celular al incremento de temperatura en presencia de diversos agentes antineoplásicos (nitrosoureas, doxorubicina, bleomicina, cisplatino, etc.), se comprobó que la mayor eficacia del citostático se lograba tras aplicarlo a temperaturas entre 40 y 43 °C, siendo los efectos menos significativos cuando su aplicación se realizaba a temperaturas por debajo o por encima de esos valores [160]. Además, como se ha indicado anteriormente, la elevación de la temperatura por encima de los 43 °C produce la destrucción total de las células [106] sin aportar beneficios terapéuticos.

En el tratamiento del mesotelioma pleural maligno, de Bree et al. [143], tras cirugía citorreductora, aplican una perfusión intrapleural durante 90 minutos de adriamicina a dosis de 15 a 25 mg/m<sup>2</sup> y cisplatino a dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> a temperatura de 40 a 41 °C, consiguiendo control local de la enfermedad durante un periodo medio de 7 meses.

Van Ruth et al. [1], en pacientes con mesotelioma pleural maligno en estadio I tratados con cirugía citorreductora, aplican durante 90 minutos una perfusión quimioterápica intrapleural a 40 °C con cisplatino a dosis fija de 80 mg/m<sup>2</sup> y doxorubicina con dosis inicial de 20 mg/m<sup>2</sup> e incrementos progresivos de 5 mg/m<sup>2</sup>, obteniendo una supervivencia media de 11 meses.

En los derrames pleurales malignos por cáncer de pulmón Shigemura et al. [144] utilizan por cirugía videoasistida, una perfusión de cisplatino a dosis de 200 mg/m<sup>2</sup> a una temperatura de 42 °C durante una o dos horas. Consiguen

dosis de citostático en pleura de 20 a 40 veces superiores a las determinadas en plasma y demuestran que usar la perfusión durante más de una hora no influye en la supervivencia media.

Refaely et al. [145], en pacientes diagnosticados de timoma con derrame pleural maligno, utilizan tras la resección quirúrgica, perfusión intrapleural de cisplatino a dosis de  $100 \text{ mg/m}^2$  durante una hora, con un flujo de 1 a 2 litros/minuto, a temperatura de 40 a 43 °C, obteniendo buen control local de la enfermedad.

En las experiencias de Matsuzaki et al. [169] en pacientes con mesotelioma, la irrigación de la cavidad torácica durante dos horas con una solución a temperatura de 42,5 a 43 °C de dos litros de suero conteniendo cisplatino a dosis de  $200 \text{ mg/m}^2$ , con extracción total del fluido de la cavidad torácica al final de la perfusión, permitió constatar un alto nivel de cisplatino en su forma libre ( $33,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$  durante la perfusión, decreciendo a  $16,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$  a las dos horas y a  $4,1 \text{ } \mu\text{g/ml}$  a las veinticuatro horas) y una adecuada actividad sobre las células pleurales [79,170], ya que histológicamente, las células muestran, tras dos horas de perfusión, hallazgos degenerativos, hinchazón celular y vacuolas intracelulares, que no estaban antes presentes. La concentración de cisplatino en suero sanguíneo después de las dos horas de perfusión pleural fue de  $1,8 \text{ } \mu\text{g/ml}$  en total y de  $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$  en su forma libre, valores que corresponden aproximadamente a la mitad y al 25% de los niveles obtenidos tras la aplicación de cisplatino a dosis de  $80 \text{ mg/m}^2$  por vía sistémica [171].

Estos hechos, demostrando durante la experiencia una concentración eficaz de cisplatino en su forma activa, nos llevaron a aceptar la concentración de  $33,7 \text{ } \mu\text{g/ml}$  de cisplatino como la dosis de citostático a emplear en nuestro estudio y las temperaturas adecuadas de aplicación las de 40 y 42 °C.

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

Aunque el mecanismo básico del daño celular por hipertermia es todavía poco conocido, distintos estudios han demostrado que la muerte celular programada o apoptosis puede ser inducida en distintas células neoplásicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, usando tratamiento hipertérmico [172,173]. La apoptosis supone un mecanismo de muerte celular programada después de la exposición de la célula a distintos mecanismos de estrés como las radiaciones, la hipertermia y algunos agentes quimioterápicos [174,175]. Su producción es controlada por múltiples señales y efectores y un variado número de complicadas reacciones bioquímicas [176,177]. De este modo, la hipertermia podría no sólo actuar aumentando el efecto citolítico de los citostáticos sino también la producción de apoptosis en las células neoplásicas [178].

Todos los mecanismos relacionados con la muerte celular están controlados por una serie de sustancias que, como hemos indicado anteriormente, se denominan globalmente con el término de citocinas, sustancias con capacidad para controlar la actividad de las células tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Las citocinas son principalmente glicoproteínas que juegan un papel crucial en la señalización célula a célula y han sido agrupadas en diversas familias de acuerdo a similitudes estructurales y funcionales. Globalmente han sido clasificadas como proinflamatorias (estimuladoras) o antiinflamatorias (inhibidoras) y su estudio ha despertado gran interés debido a la selectividad que presentan para activar y dirigir el tráfico de diferentes subpoblaciones de leucocitos. Inicialmente clasificadas como quimiotácticas, hoy se sabe que

cumplen además funciones importantes en la regulación de la proliferación y apoptosis de diferentes células, la morfogénesis tisular, la hematopoyesis y la angiogénesis.

Las quimiocinas son un grupo de citocinas constituidas por polipéptidos de bajo peso molecular (8 a 14 KDa), con un dominio característico [123], que se dividen en 4 subfamilias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ , siendo las quimiocinas alfa y beta las que presentan una acción más preponderante a nivel pulmonar.

En efecto, la subfamilia de quimiocinas  $\alpha$  es responsable de importantes acciones sobre las células como quimiotaxis de linfocitos, neutrófilos, monocitos y basófilos, activación y proliferación celular, regulación de la angiogénesis, modulación de la hematopoyesis, etc. [119,179]. Entre las que poseen un papel relacionado con los fenómenos inflamatorios destaca la IL-8 (KC del ratón) con poder quimioatrayente y activador de los neutrófilos, estimulación de la fagocitosis por los macrófagos e importante actividad angiogénica. Sus fuentes celulares son muy diversas e incluyen: monocitos, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos, hepatocitos, neutrófilos, eosinófilos, astrocitos, plaquetas, linfocitos T y B, NK, células endoteliales y células epiteliales.

La serosa pleural y el tejido submesotelial son asiento de distintas células, principalmente células mesoteliales multipotenciales, células del tejido conectivo submesotelial, monocitos y granulocitos, todas ellas con capacidad para expresar IL-8 y en el caso del animal de experimentación elegido, su homónima en el ratón, la citocina KC. De acuerdo con estos hechos resulta lógico pensar que el estudio de las modificaciones de esta proteína inducidas a nivel de las células mesoteliales por agentes terapéuticos como la hipertermia y la quimioterapia podría resultar útil para el conocimiento de la dinámica celular ante la exposición a estos agentes.

Entre las quimiocinas  $\beta$ , producidas por monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, fibroblastos, células NK, endotelio, células epiteliales y mastocitos, destacan MCP-1, MIP-1 a MIP-4 y RANTES que actúan principalmente como quimioatrayentes de monocitos y linfocitos T, aunque también actúan sobre eosinófilos, basófilos, linfocitos B, timocitos y NF. También tienen capacidad para modular la apoptosis y, en colaboración con otras citocinas (IL-2 e INF- $\gamma$ ), inducir la proliferación y activación de células NK [132,180]. Así mismo, su producción por células presentes a nivel de la serosa pleural, nos hace considerar su utilidad para esclarecer los objetivos de nuestro estudio.

Teniendo en cuenta sus acciones, la producción de estas quimiocinas (alfa y beta) a nivel pleural, podría ser inducida por distintos estímulos en diferentes células (neutrófilos, linfocitos T, monocitos, basófilos) e inducir fenómenos de atracción y activación de los neutrófilos, de fagocitosis por los macrófagos y de regulación de la angiogénesis como respuesta al estímulo [121]. Las variaciones de su producción 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.

Como ya hemos afirmado, la detección simultánea de distintas citocinas proporciona una herramienta poderosa para su estudio, ya que las interacciones de estímulos positivos y negativos son complejas e implican frecuentemente a múltiples citocinas [11]. Las quimiocinas muestran gran redundancia en la utilización de sus receptores. De esta manera, varias quimiocinas pueden acoplarse a un mismo receptor y una quimiocina puede ligarse a varios receptores, pudiendo producirse señales intracelulares distintas (pleiotropía y redundancia). Teniendo en cuenta estos hechos, conocer la expresión de aquellas proteínas que pudieran ser señalizadoras de la dinámica de los acontecimientos que suceden en las células pleurales como respuesta a la acción

de la hipertermia y el cisplatino, nos hizo considerar la necesidad del empleo de un sistema de detección múltiple y simultáneo de las proteínas proinflamatorias presentes en las células pleurales en cada una de las fases del estudio.

Medir simultáneamente múltiples citocinas sería vital para revelar el trabajo neto de éstas. En los últimos años, diversos estudios han mostrado los avances en el descubrimiento y desarrollo de sistemas que permiten la detección simultánea y la correcta determinación de múltiples citocinas [181]. Estos métodos se basan en un modelo o formato de *arrays* que permite la detección de proteínas en diversos medios, principalmente suero, precisando mínimas cantidades de producto para lograr la adecuada determinación [182].

La utilización de estos métodos basados en la miniaturización con *microarrays* de proteínas nos permitió una drástica reducción de la cantidad de muestra requerida (típicamente de 10-100  $\mu$ l), un incremento en el número de analizadores que podían ser medidos simultáneamente, mantener la relativa expresión de los niveles dentro de la misma muestra y, a semejanza de lo que ocurre en otras patologías, hacer posible la determinación de la relación entre las distintas proteínas involucradas en el problema que nos ocupa [180,183].

Teniendo en cuenta estos hechos y el de la señalada influencia de algunas proteínas proinflamatorias en la respuesta celular frente a distintos agentes quimioterápicos [9], consideramos útil diseñar este estudio para intentar establecer en cultivos de células pleurales y distintas condiciones de temperatura, la relación entre la expresión de diferentes proteínas proinflamatorias y la producción de apoptosis y necrosis celular y precisar la dinámica de acción sobre estas células de la hipertermia y la administración de cisplatino.

La elección de un determinado *array* conteniendo las distintas proteínas cuya expresión a nivel de las células pleurales del ratón pudiera contribuir a

esclarecer la dinámica y cronología de la producción de muerte celular en las condiciones señaladas para los distintos grupos experimentales, fue pormenorizadamente estudiada.

En efecto, el RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc., contiene las proteínas IL-6, MIP-2, G-CSF, IL-10, KC, MCP-1, MCP-5, RANTES, TIMP-1 y sTNF-R, presentes a nivel de la población celular pleural del animal de experimentación elegido, y su detección simultánea permite la posibilidad de determinar su interacción 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 muerte celular.

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

Empleando este método se pudo constatar que a 37 °C, la célula mesotelial expresa distintas citocinas: IL-6, MIP-2, G-CSF, IL-10, KC, MCP-1, MCP-5, RANTES, TIMP-1 y sTNF-R. El ascenso de la temperatura a 40 °C durante dos horas se acompaña de la desaparición de la expresión de IL-10, pero fundamentalmente del mantenimiento de un alto nivel de expresión de cinco proteínas: IL-6 (80%), MIP-2 (90%), KC (100%), MCP-5 (90%), RANTES (100%) y TIMP-1 (75%) y la disminución marcada de G-CSF (30%), MCP-1 (45%) y sTNF-R (40%). Cuando la temperatura es elevada a 42 °C durante dos horas se produce un descenso importante de la expresión de IL-6 (30%), KC (40%) y TIMP-1 (5%), manteniéndose en niveles altos MIP-2 (70%), MCP-5 (70%) y RANTES (90%).

Conociendo la naturaleza de las distintas familias de citocinas, se podría 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. Teniendo en cuenta su acción, podrían estar en relación con la puesta en marcha de mecanismos de regulación de la estructura y viabilidad celular como respuesta a la hipertermia. Concomitantemente se comprueba la desaparición de proteínas inmunosupresoras e inhibidoras de la síntesis de otras citocinas antiinflamatorias (IL-10), la disminución marcada de la proteína bloqueadora del TNF, inhibidora de la actividad proinflamatoria de la célula (sTNF-R), de estimulantes de las células precursoras de los neutrófilos (G-CSF) y de otras como MCP-1, reclutadora de monocitos y macrófagos. La traducción de estos hechos podría resumirse en el mantenimiento frente a la hipertermia de la producción por las células pleurales de citocinas con potente capacidad de

atracción de neutrófilos y la disminución marcada de las inhibidoras de la actividad proinflamatoria a nivel de dichas células.

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 estarían en concordancia con el porcentaje observado de células con pérdida de su actividad vital y su ulterior fagocitosis por los monocitos y los macrófagos.

**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?**

Tras añadir al cultivo celular cisplatino, el hecho más notable fue el marcado descenso con la hipertermia de la expresión de las proteínas expresadas por la célula mesotelial. En efecto, 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 expresadas restando tan sólo presente una discreta expresión considerable de IL-6 (30%), citocina con actividad pro y antiinflamatoria que interviene en la producción de proteínas de fase aguda, pero con acción inhibidora de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, INF $\gamma$ ) y de MIP-2 (40%) que presenta capacidad quimiotáctica para los leucocitos PMN y las células hematopoyéticas. En definitiva, la adición del citostático anula progresivamente la producción de citocinas por las células a medida que se eleva la temperatura y su desaparición conlleva a investigar el estado real de las células tras la administración del citostático.

En los estudios que han evaluado la acción simultánea del choque térmico y los citostáticos, una óptima respuesta fue obtenida cuando fue administrado cisplatino, nitrosoureas o L-fenilalanina [184]. Como ya ha sido comentado y razonado, el cisplatino es el agente quimioterápico más ampliamente usado para el tratamiento de los tumores malignos pleurales. Su capacidad para la inducción de la apoptosis en las células malignas ha podido ser también claramente demostrada [123]. Intentar con su empleo la inducción de apoptosis en las células pleurales malignas podría ser considerado como razonable en el contexto de la perfusión quimioterápica hipertérmica. Sin embargo, el mecanismo preciso de la inducción de apoptosis *versus* necrosis por el empleo conjunto de la hipertermia y el cisplatino no ha sido aún

completamente determinado y adicionalmente la efectividad de la quimioterapia intrapleural hipertérmica aún no bien clarificada.

En las dos últimas décadas el conocimiento de la fisiología y genética de la apoptosis ha avanzado sustancialmente y ello ha ayudado a dar forma a modelos de estudio para intentar comprender las variaciones observadas en la quimiosensibilidad clínica de los tumores [185]. Como afirman Fennell et al. [186], en el caso del mesotelioma, la limitada efectividad de las drogas citotóxicas y la radioterapia implica un importante defecto funcional en la señalización de la apoptosis. Este principio se extiende en oncología a la mayor parte de los tumores sólidos y, por ello, el incremento del conocimiento de los bloques moleculares en la vía patológica de la apoptosis resultaría necesario para el desarrollo de nuevos y efectivos tratamientos. Comparadas con las células mesoteliales sanas, las células del mesotelioma son más resistentes a la inducción de apoptosis *in vitro* [177], lo que sugiere que la resistencia de estas células pudiera relacionarse con la expresión insuficiente de reguladores centrales del ciclo celular y la susceptibilidad a la apoptosis, como el p53. El núcleo de la maquinaria apoptótica encuentra bajo caudal de p53 e integra un diverso rango de estímulos preapoptóticos así como señales de supervivencia que surgen de factores de crecimiento micromedioambientales. La vía patológica final común provoca la activación de las caspasas, que inducen la apoptosis. La mitocondria juega una parte esencial en su activación. Concomitantemente a la apoptosis acontece una incrementada permeabilidad de las membranas mitocondriales interna y externa, un evento mediado por el redundante dominio proapoptótico de la familia de proteínas Bcl-2, principalmente Bax y Bak que facilitan la salida del citocromo c del espacio intermembrana de la mitocondria, la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas.

El fallo en la liberación de este factor apoptogénico es una importante causa de represión de la apoptosis en el cáncer y podría ser especialmente relevante en el mesotelioma. La familia de proteínas proapoptóticas y

antiapoptóticas Bcl-2 actuaría de una manera opuesta para promover o inhibir respectivamente, la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, la proteína Bcl-XL es una potente represora de la apoptosis y se expresa comúnmente en el mesotelioma [187]. Sin embargo, la resistencia a los estímulos apoptóticos *in vitro* no se correlaciona con la expresión de Bcl-2, sugiriendo falta de un papel funcional para esta proteína en la regulación de la apoptosis celular en el mesotelioma.

En adición, la supervivencia en pacientes con mesotelioma no ha podido ser prevista por la expresión de estas proteínas. Este hallazgo podría ser el resultado de la redundancia de proteínas antiapoptóticas que inhiben la acción de las caspasas [153]. Resultados de recientes estudios encaminados a lograr importante apoptosis de las células neoplásicas, como los logrados *in vitro* mediante la interacción sinérgica de cisplatino con el ligando soluble de Fas (sFasL) [188], o dirigidos a detener la mitosis celular mediante la inhibición de genes implicados en la apoptosis [189], apuntan nuevas posibilidades para contrarrestar la agresividad celular y la resistencia al tratamiento quimiorradioterápico del mesotelioma.

En nuestro estudio, la apoptosis y la necrosis celular producidas por la hipertermia se modificó claramente con la adición de cisplatino en el sobrenadante celular. Así, a 37 °C el porcentaje de células en apoptosis es mínimo (2,90%) y el de células necrosadas asciende al 16,81%. La elevación de la temperatura a 40 °C aumenta discretamente el porcentaje de células en apoptosis a 5,46% y hasta el 17,90% el de células necrosadas. A 42 °C no se producen casi modificaciones en el porcentaje de células en apoptosis y en necrosis (6,27% y 15,59%, respectivamente). La adición de cisplatino incrementa de forma notoria, a todas las temperaturas, el porcentaje de células en apoptosis (7,86% a 37 °C; 14,10% a 40 °C y 15,05% a 42 °C) y de células necrosadas (23,49% a 37 °C; 30,77% a 40 °C y 25,82% a 42 °C).

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

## **G.- Conclusiones**

## Conclusiones

1. En concordancia con la similitud entre las proteínas del *Mus musculus* y sus equivalentes proteicos en el hombre, consideramos que 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.
2. La metodología fijada para el estudio *in vitro* de 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 medicamento antitumoral.
3. Como demuestra el análisis de los resultados, 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, permitió 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.
4. Conociendo la naturaleza de las distintas familias de citocinas, podemos 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 marcada 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.

5. 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 estarían en concordancia con el porcentaje observado en estas condiciones de células con pérdida de su actividad vital y su ulterior fagocitosis por los monocitos y macrófagos.
6. 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.
7. 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 celular 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.

8. La aceptación en nuestro estudio de 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, nos ha permitido corroborar su capacidad para incrementar el grado de apoptosis y necrosis celular en la muestra a medida que se eleva la temperatura.
9. Los resultados obtenidos permiten reafirmar la idoneidad de la concentración activa de cisplatino de 33,7 µg/ml en líquido de lavado pleural señalada como idónea en destacados estudios clínicos, máxime teniendo en cuenta las bajas concentraciones en plasma del citostático halladas en esos estudios durante la perfusión intrapleural hipertérmica del medicamento.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

## **H.- Bibliografía**

## Bibliografia

- 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, Muraliharan 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 **Beltrán de Heredia JM.** Patología quirúrgica de las pleuras. En de la Fuente Chaos A, Director. *Patología Quirúrgica. Tomo III, 1ª parte: Cirugía de la pared torácica, mamas, pleura, pulmón y esófago.* Editorial Científico Médica. Barcelona 1966, pág 249.
- 13 **Langman J.** Celoma y mesenterios. En Langman J. *Embriología Médica. Nueva* Editorial Interamericana SA. México 1969, págs 248-260.
- 14 **Wang NS.** Anatomy of the pleura. *Clin Chest Med* 1998; 19: 229-240.
- 15 **Bernaudin JF, Fleury J.** Histologie et cytopathologie de la plèvre. *Encycl Méd Chir (Paris, France), Poumon, 6040 R10, 9-1986, 6 p.*
- 16 **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.

- 17 **Zlotnik A, Yoshie O.** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.
- 18 **Antony VB.** Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 539-544.
- 19 **Greillier L, Piloni J.-M, Fraticelli A, Astoul P.** Méthodes d'investigation de la plèvre. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Pneumologie, 6-000 F-55, 2005.*
- 20 **Sahn SA.** Pleural effusions of extravascular origin. *Clin Chest Med* 2006; 27: 285-308.
- 21 **Bravo Bravo JL, Alix Trueba A, García Prim JM, Mañes Bonet M.** Tumores de la pleura y derrames pleurales malignos. En Caminero Luna JA, Fernández Fau L, Editores. *Manual de Neumología y Cirugía Torácica. Editores Médicos SA. Madrid 1998, págs 1709-1719.*
- 22 **Monnet I, Abd-Al-Samad I, Jaurand MC, Fuhrman C, Bignon J.** Mésothéliome pleural malin. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Pneumologie, 6002- H-10, 1999, 12 p.*
- 23 **Rosell R.** Mesotelioma maligno. En Rosell R, Abad A, Monzó M, Molina F, Editores. *Oncología Médica. Ediciones Ergón SA. Madrid 1995, págs 179-184.*
- 24 **Lago Viguera J.** Neoplasias. Tumores pleurales y de la pared torácica. Metástasis pulmonares. En Martín Escribano P, Ramos Seisdedos G, Sanchis Aldás J, Editores. *Medicina Respiratoria. Aula Médica Ediciones. Madrid 2006, págs 1113-1123.*
- 25 **Cancer Incidence in Five Continents. Volume VIII.** Edited by Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. *IARC Scientific Publications No. 155. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2002, p 594-596.*

- 
- 26 **All About Malignant Mesothelioma: Your Mesothelioma Information Source™.**  
© 2005-2007 Ceatus Media Group LLC.  
  
<http://www.allaboutmalignantmesothelioma.com>
- 27 **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.
- 28 **Dogan AU, Baris YI, Dogan M, Emri S, Steele I, Elmishad AG, Carbone M.** Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in Turkey. *Cancer Res* 2006; 66: 5063-5068.
- 29 **De Rienzo A, Tor M, Sterman DH, Aksoy F, Albelda SM, Testa JR.** Detection of SV40 DNA sequences in malignant mesothelioma specimens from the United States, but not from Turkey. *J Cell Biochem* 2002; 84:455-459.
- 30 **Kanbay A, Oguzulgen KI, Ozturk C, Memis L, Demircan S, Kurkcuoglu C, Akyurek N, Kurul C.** Malignant pleural mesothelioma with scalp, cerebellar, and finger metastases: a rare case. *South Med J* 2007; 100: 63-65.
- 31 **Flores RM, Akhurst T, Gonen M, Zakowski M, Dycoco J, Larson SM, Rusch VW.** Positron emission tomography predicts survival in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 763-768.
- 32 **Aelony Y, Yao JF, King RR.** Prognostic value of pleural fluid pH in malignant epithelial mesothelioma after talc poudrage. *Respiration* 2006; 73: 334-339.
- 33 **Agarwal PP, Seely JM, Matzinger FR, MacRae RM, Peterson RA, Maziak DE, Dennie CJ.** Pleural mesothelioma: sensitivity and incidence of needle track seeding after image-guided biopsy versus surgical biopsy. *Radiology* 2006; 241: 589-594.

- 
- 34 **Yaziji H, Battifora H, Barry TS, Hwang HC, Bacchi CE, McIntosh MW, Kussick SJ, Gown AM.** Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three-antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Mod Pathol* 2006; 19: 514-523.
- 35 **Mimura T, Ito A, Sakuma T, Ohbayashi C, Yoshimura M, Tsubota N, Okita Y, Okada M.** Novel marker D2-40, combined with calretinin, CEA, and TTF-1: an optimal set of immunodiagnostic markers for pleural mesothelioma. *Cancer* 2007; 109: 933-938.
- 36 **Beyer HL, Geschwindt RD, Glover CL, Tran L, Hellstrom I, Hellstrom KE, Miller MC, Verch T, Allard WJ, Pass HI, Sardesai NY.** MESOMARK™: A Potential Test for Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin Chem* 2007; 53: 666-672.
- 37 **Butchart EG, Ashcroft T, Barnsley WC, Holden MP.** Pleuropneumonectomy in the management of diffuse malignant mesothelioma of the pleura. Experience with 29 patients. *Thorax* 1976; 31: 15-24.
- 38 **Boutin C, Monnet I, Ruffie P, Astoul P.** Malignant mesothelioma: clinical and therapeutic study. *Rev Mal Respir* 1999; 16: 1317-1326.
- 39 **Sugarbaker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT, Richards WG, Strauss GM, Corson JM, DeCamp MM Jr, Swanson SJ, Bueno R, Lukanich JM, Baldini EH, Mentzer SJ.** Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 54-65.
- 40 **Rusch VW.** A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma from the International Mesothelioma Interest Group. *Lung Cancer* 1996; 14: 1-12.

- 
- 41 **Pass HI.** Malignant pleural mesothelioma: surgical roles and novel therapies. *Clin Lung Cancer* 2001; 3: 102-117.
- 42 **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.
- 43 **Chang MY, Sugarbaker DJ.** Extrapleural pneumonectomy for diffuse malignant pleural mesothelioma: techniques and complications. *Thorac Surg Clin* 2004; 14: 523-530.
- 44 **Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT, Bueno R, Richards W, Lukanich J, Mentzer SJ, Colson Y, Linden P, Chang M, Capalbo L, Oldread E, Neragi-Miandoab S, Swanson SJ, Zellos LS.** Prevention, early detection, and management of complications after 328 consecutive extrapleural pneumonectomies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 138-146.
- 45 **De Perrot M, Uy K, Anraku M, Tsao MS, Darling G, Waddell TK, Pierre AF, Bezjak A, Keshavjee S, Johnston MR.** Impact of lymph node metastasis on outcome after extrapleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 111-116.
- 46 **Stewart DJ, Martin-Ucar A, Pilling JE, Edwards JG, O'Byrne KJ, Waller DA.** The effect of extent of local resection on patterns of disease progression in malignant pleural mesothelioma. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 245-252.
- 47 **Edwards JG, Stewart DJ, Martin-Ucar A, Muller S, Richards C, Waller DA.** The pattern of lymph node involvement influences outcome after extrapleural pneumonectomy for malignant mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 981-987.

- 
- 48 **Heras Gómez F, Ramos Seisedos G, Duque Medina JL, García-Yuste Martín M, Castanedo Allende M, Matilla González JM, Quiroga Martínez J, Gregorio Crespo B, Cabanyes Candela S.** Derivación pleuroperitoneal con válvula unidireccional en los derrames pleurales recidivantes persistentes. *Cir Esp* 2006; 80 Supl 1: 109-110.
- 49 **Waite K, Gilligan D.** The role of radiotherapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Clinical Oncology* 2007; 19: 182-187.
- 50 **Senan S.** Indications and limitations of radiotherapy in malignant pleural mesothelioma. *Curr Opin Oncol* 2003; 15: 144-147.
- 51 **Chan MF, Chui CS, Song Y, Burman C, Yorke E, Della-Biancia C, Rosenzweig KE, Schupak K.** A novel radiation therapy technique for malignant pleural mesothelioma combining electrons with intensity-modulated photons. *Radiother Oncol* 2006; 79: 218-223.
- 52 **Allen AM, Czerminska M, Janne PA, Sugarbaker DJ, Bueno R, Harris JR, Court L, Baldini EH.** Fatal pneumonitis associated with intensity-modulated radiation therapy for mesothelioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 640-645.
- 53 **Chapman E, Berenstein EG, Dieguez M, Ortiz Z.** Radiotherapy for malignant pleural mesothelioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3: CD003880.
- 54 **Favaretto AG, Aversa SM, Paccagnella A, Manzini Vde P, Palmisano V, Oniga F, Stefani M, Rea F, Bortolotti L, Loreggian L, Monfardini S.** Gemcitabine combined with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma: a multicentric phase II study. *Cancer* 2003; 97: 2791-2797.

- 
- 55 **Pinto C, Marino A, De Pangher Manzini V, Benedetti G, Galetta D, Mazzanti P, Del Conte G, dell'Amore D, Piana E, Giaquinta S, Lopez M, Martoni A.** Sequential chemotherapy with cisplatin/gemcitabine (CG) followed by mitoxantrone/methotrexate/mitomycin (MMM) in patients with malignant pleural mesothelioma. A multicenter Italian Phase II Study (SITMP1). *Lung Cancer* 2006; 52: 199-206.
- 56 **Green J, Dundar Y, Dodd S, Dickson R, Walley T.** Pemetrexed disodium in combination with cisplatin versus other cytotoxic agents or supportive care for the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 24: CD005574.
- 57 **Dundar Y, Bagust A, Dickson R, Dodd S, Green J, Haycox A, Hill R, McLeod C, Walley T.** Pemetrexed disodium for the treatment of malignant pleural mesothelioma: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2007; 11: 1-90.
- 58 **Aelony Y.** Raltitrexed and pemetrexed studies in mesothelioma have not shown improved quality of life nor prolonged survival compared with effective pleurodesis with thoracoscopic talc poudrage. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4667.
- 59 **Metintas M, Ak G, Erginel S, Alatas F, Yildirim H, Kurt E, Metintas S.** A retrospective analysis of malignant pleural mesothelioma patients treated either with chemotherapy or best supportive care between 1990 and 2005 A single institution experience. *Lung Cancer* 2007; 55: 379-387.
- 60 **Ellis P, Davies AM, Evans WK, Haynes AE, Lloyd NS; the Lung Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care.** The Use of Chemotherapy in Patients with Advanced Malignant Pleural Mesothelioma: A Systematic Review and Practice Guideline. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 591-601.
- 61 **Ho L, Sugarbaker DJ, Skarin AT.** Malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Res* 2001; 105: 327-373.

- 62 **Flores RM.** Induction chemotherapy, extrapleural pneumonectomy, and radiotherapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Lung Cancer* 2005; 49 Suppl 1: S71-74.
- 63 **Opitz I, Kestenholz P, Lardinois D, Muller M, Rousson V, Schneiter D, Stahel R, Weder W.** Incidence and management of complications after neoadjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29: 579-584.
- 64 **Stewart DJ, Martin-Ucar AE, Edwards JG, West K, Waller DA.** Extra-pleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma: the risks of induction chemotherapy, right-sided procedures and prolonged operations. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27: 373-378.
- 65 **Rea F, Marulli G, Bortolotti L, Breda C, Favaretto AG, Loreggian L, Sartori F.** Induction chemotherapy, extrapleural pneumonectomy (EPP) and adjuvant hemi-thoracic radiation in malignant pleural mesothelioma (MPM): Feasibility and results. *Lung Cancer* 2007; 57: 89-95.
- 66 **Flores RM, Krug LM, Rosenzweig KE, Venkatraman E, Vincent A, Heelan R, Akhurst T, Rusch VW.** Induction chemotherapy, extrapleural pneumonectomy, and postoperative high-dose radiotherapy for locally advanced malignant pleural mesothelioma: a phase II trial. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 289-295.
- 67 **Lucchi M, Chella A, Melfi F, Dini P, Ambrogi M, Fino L, Fontanini G, Mussi A.** A phase II study of intrapleural immuno-chemotherapy, pleurectomy/decortication, radiotherapy, systemic chemotherapy and long-term sub-cutaneous IL-2 in stage II-III malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 31: 529-534.
- 68 **Heguy A, Crystal RG.** Intrapleural 'outside-in' gene therapy: therapeutics for organs of the chest via gene transfer to the pleura. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7: 440-453.

- 69 **Adusumilli PS, Stiles BM, Chan MK, Mullerad M, Eisenberg DP, Ben-Porat L, Huq R, Rusch VW, Fong Y.** Imaging and therapy of malignant pleural mesothelioma using replication-competent herpes simplex viruses. *J Gene Med* 2006; 8: 603-615.
- 70 **Sterman DH, Recio A, Vachani A, Sun J, Cheung L, DeLong P, Amin KM, Litzky LA, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM.** Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7444-7453.
- 71 **Van der Most RG, Robinson BW, Nelson DJ.** Gene therapy for malignant mesothelioma: beyond the infant years. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 897-904.
- 72 **Adusumilli PS, Chan MK, Hezel M, Yu Z, Stiles BM, Chou TC, Rusch VW, Fong Y.** Radiation-induced cellular DNA damage repair response enhances viral gene therapy efficacy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 258-269.
- 73 **Van Ruth S, van Tellingen O, Korse CM, Verwaal VJ, Zoetmulder FA.** Pharmacokinetics of doxorubicin and cisplatin used in intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy after cytoreductive surgery for malignant pleural mesothelioma and pleural thymoma. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 57-65.
- 74 **Richards WG, Zellos L, Bueno R, Jaklitsch MT, Janne PA, Chirieac LR, Yeap BY, Dekkers RJ, Hartigan PM, Capalbo L, Sugarbaker DJ.** Phase I to II study of pleurectomy/decortication and intraoperative intracavitary hyperthermic cisplatin lavage for mesothelioma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1561-1567.
- 75 **Schwarz C, Lubbert H, Rahn W, Schonfeld N, Serke M, Loddenkemper R.** Medical thoracoscopy: hormone receptor content in pleural metastases due to breast cancer. *Eur Respir J* 2004; 24: 728-730.

- 
- 76 **Burrows CM, Mathews WC, Colt HG.** Predicting survival in patients with recurrent sintomatic malignant pleural effusions: an assessment of the prognostic values of physiologic, morphologic, and quality of life measures of extent of disease. *Chest* 2000; 117: 73-78.
- 77 **Diacon AH, Wyser C, Bolliger CT, Tamm M, Pless M, Perruchoud AP, Soler M.** Prospective randomized comparison of thoracoscopic talc poudrage under local anesthesia versus bleomycin instillation for pleurodesis in malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1445-1449.
- 78 **Stefani A, Natali P, Casali C, Morandi U.** Talc poudrage versus talc slurry in the treatment of malignant pleural effusion. A prospective comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30: 827-832.
- 79 **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.
- 80 **Milani V, Noessner E.** Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 312-319.
- 81 **Clarke PG.** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181: 195-213.
- 82 **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 83 **Evan G, Littlewood T.** A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322.
- 84 **Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ.** The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 2003; 4: 404-409.
- 85 **Denault JB, Salvesen GS.** Apoptotic caspase activation and activity. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 191-220.

- 
- 86 **Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
- 87 **Salvesen GS.** Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 2002; 38: 9-19.
- 88 **Stennicke HR, Salvesen GS.** Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1387: 17-31.
- 89 **Thornberry NA, Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- 90 **Reed JC.** Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236.
- 91 **Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
- 92 **Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC.** Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005; 19: 1294-1305.
- 93 **Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 1899-1911.
- 94 **Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB.** BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001; 15: 1481-1486.
- 95 **Green DR, Reed JC.** Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
- 96 **Danial NN, Korsmeyer SJ.** Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
- 97 **Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-252.

- 
- 98 **Ambrosini G, Adida C, Altieri DC.** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921.
- 99 **Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304.
- 100 **Xanthoudakis S, Nicholson DW.** Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol* 2000; 2: E163-165.
- 101 **Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 469-475.
- 102 **Concannon CG, Orrenius S, Samali A.** Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 2001; 9: 195-201.
- 103 **Van der Zee J.** Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol* 2002; 13: 1173-1184.
- 104 **Dietzel F.** Basic principles in hyperthermic tumor therapy. *Recent Results Cancer Res* 1983; 86: 177-190.
- 105 **Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Jones E, Thrall D.** Re-setting the biologic rationale for thermal therapy. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 779-790.
- 106 **Hildebrandt B, Wust P.** Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Res* 2007; 134: 185-193.
- 107 **Hildebrandt B, Wust P.** The biologic rationale of hyperthermia. *Cancer Treat Res* 2007; 134: 171-184.

- 108 **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.
- 109 **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.
- 110 **Sugarbaker PH.** Laboratory and clinical basis for hyperthermia as a component of intracavitary chemotherapy. *Int J Hyperthermia* 2007; 23: 431-442.
- 111 **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.
- 112 **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.
- 113 **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.
- 114 **Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
- 115 **Steensma DP, Timm M, Witzig TE.** Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. *Methods Mol Med* 2003; 85: 323-332.
- 116 **Bossy-Wetzel E, Green DR.** Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol* 2000; 322: 15-18.

- 
- 117 **Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G.** Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 1997; 23: 525-531.
- 118 **Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H.** The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 2006; 7: 243.
- 119 **Barrett JR.** Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928.
- 120 **Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ.** Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 11703-11706.
- 121 **Baggiolini M, Dewald B, Moser B.** Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.
- 122 **Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ.** Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; 254: 99-102.
- 123 **Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP.** Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 723-742.
- 124 **Baggiolini M, Loetscher P.** Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 418-420.
- 125 **Gallin JI, Farber JM, Holland SM, Nutman TB.** Interferon-gamma in the management of infectious diseases. *Ann Intern Med* 1995; 123: 216-224.
- 126 **Gross PL, Aird WC.** The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 463-478.
- 127 **Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG.** Systemic inflammation after trauma. *Injury* 2007; 38: 1336-1345.
- 128 **Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR.** Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-190.

- 
- 129 **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.
- 130 **Dellinger RP.** Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1259-1265.
- 131 **Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S.** Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 1205-1208.
- 132 **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.
- 133 **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.
- 134 **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.
- 135 **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.
- 136 **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.

- 137 **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.
- 138 **Grimbaldeston 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.
- 139 **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.
- 140 **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.
- 141 **Prussin C.** Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 1997; 17: 195-204.
- 142 **Yellin A, Simansky DA, Paley M, Refaely Y.** Hyperthermic pleural perfusion with cisplatin: early clinical experience. *Cancer* 2001; 92: 2197-2203.
- 143 **De Bree E, van Ruth S, Baas P, Rutgers EJ, van Zandwijk N, Witkamp AJ, Zoetmulder FA.** Cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma or pleural metastases of thymoma. *Chest* 2002; 121: 480-487.
- 144 **Shigemura N, Akashi A, Nakagiri T, Hazama K, Ohta M, Matsuda H.** Pleural perfusion thermo-chemotherapy under VATS: a new less invasive modality for advanced lung cancer with pleural spread. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1016-1022.

- 145 **Refaely Y, Simansky DA, Paley M, Gottfried M, Yellin A.** Resection and perfusion thermochemotherapy: a new approach for the treatment of thymic malignancies with pleural spread. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 366-370.
- 146 **Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E.** The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999; 79: 666-672.
- 147 **Nowak AK, Lake RA, Kindler HL, Robinson BW.** New approaches for mesothelioma: biologics, vaccines, gene therapy, and other novel agents. *Semin Oncol* 2002; 29: 82-96.
- 148 **Bakhshandeh A, Bruns I, Traynor A, Robins HI, Eberhardt K, Demedts A, Kaukel E, Koschel G, Gatzemeier U, Kohlmann T, Dalhoff K, Ehlers EM, Gruber Y, Zumschlinge R, Hegewisch-Becker S, Peters SO, Wiedemann GJ.** Ifosfamide, carboplatin and etoposide combined with 41.8 degrees C whole body hyperthermia for malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 2003; 39: 339-345.
- 149 **Xia H, Karasawa K, Hanyu N, Chang TC, Okamoto M, Kiguchi Y, Kawakami M, Itazawa T.** Hyperthermia combined with intra-thoracic chemotherapy and radiotherapy for malignant pleural mesothelioma. *Int J Hyperthermia* 2006; 22: 613-621.
- 150 **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- 151 **NicAmhlaobh R, Heenan M, Cleary I, Touhey S, O'Loughlin C, Daly C, Nuñez G, Scanlon KJ, Clynes M.** Altered expression of mRNAs for apoptosis-modulating proteins in a low level multidrug resistant variant of a human lung carcinoma cell line that also expresses *mdr1* mRNA. *Int J Cancer* 1999; 82: 368-376.
- 152 **Sartorius UA, Krammer PH.** Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer* 2002; 97: 584-592.

- 153 **Soini Y, Kinnula V, Kaarteenaho-Wiik R, Kurttila E, Linnainmaa K, Pääkkö P.** Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins bcl-2, mcl-1, bcl-X, and bax in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3508-3515.
- 154 **Cao XX, Mohuiddin I, Ece F, McConkey DJ, Smythe WR.** Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 562-568.
- 155 **Hopkins-Donaldson S, Cathomas R, Simões-Wüst AP, Kurtz S, Belyanskaya L, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U.** Induction of apoptosis and chemosensitization of mesothelioma cells by Bcl-2 and Bcl-xL antisense treatment. *Int J Cancer* 2003; 106: 160-166.
- 156 <http://www.migui.com/ciencias/biologia/organismos-modelo.html>
- 157 **Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al.** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-562.
- 158 <http://www.evolutionpages.com/Mouse%20genome%20proteins.htm>
- 159 **Liao BY, Zhang J.** Evolutionary conservation of expression profiles between human and mouse orthologous genes. *Mol Biol Evol* 2006; 23: 530-540.
- 160 **Storm FK.** Clinical hyperthermia and chemotherapy. *Radiol Clin North Am* 1989; 27: 621-627.
- 161 **Stewart JR, Gibbs FA Jr.** Hyperthermia in the treatment of cancer. Perspectives on its promise and its problems. *Cancer* 1984; 54 (11 Suppl): 2823-2830.
- 162 **Hahn GM.** Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res* 1979; 39: 2264-2268.
- 163 **Hahn GM, Braun J, Har-Kedar I.** Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42-43 degrees) and adriamycin (of bleomycin) in mammalian cell inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 937-940.

- 164 Muckle DS, Dickson JA.** Hyperthermia (42 degrees C) as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy in the treatment of the allogeneic VX2 carcinoma in the rabbit. *Br J Cancer* 1973; 27: 307-315.
- 165 Dahl O, Mella O.** Effect of timing and sequence of hyperthermia and cyclophosphamide on a neurogenic rat tumor (BT4A) in vivo. *Cancer* 1983; 52: 983-987.
- 166 Marmor JB.** Interactions of hyperthermia and chemotherapy in animals. *Cancer Res* 1979; 39: 2269-2276.
- 167 Marmor JB, Kozak D, Hahn GM.** Effects of systemically administered bleomycin or adriamycin with local hyperthermia on primary tumor and lung metastases. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1279-1290.
- 168 Fisher B, Kraft P, Hahn GM, Anderson RL.** Thermotolerance in the absence of induced heat shock proteins in a murine lymphoma. *Cancer Res* 1992; 52: 2854-2861.
- 169 Matsuzaki Y.** Experimental studies of hyperthermia against MH134 tumor on mice. Antitumor effects under various conditions of heating. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1984; 85: 633-642.
- 170 Matsuzaki Y, Yoshioka M, Yonezawa T, Onitsuka T, Shibata K, Koga Y.** Thermotolerance in regional hyperthermia in vivo--an experimental study using the MH134 tumor. *Jpn J Surg* 1991; 21: 69-74.
- 171 Matsuzaki Y, Shibata K, Yoshioka M, Inoue M, Sekiya R, Onitsuka T, Iwamoto I, Koga Y.** Intrapleural perfusion hyperthermo-chemotherapy for malignant pleural dissemination and effusion. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 127-131.
- 172 Harmon BV, Takano YS, Winterford CM, Gobé GC.** The role of apoptosis in the response of cells and tumours to mild hyperthermia. *Int J Radiat Biol* 1991; 59: 489-501.

- 173 **Falcieri E, Luchetti F, Burattini S, Canonico B, Santi S, Papa S.** Lineage-related sensitivity to apoptosis in human tumor cells undergoing hyperthermia. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 135-144.
- 174 **Barry MA, Behnke CA, Eastman A.** Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2353-2362.
- 175 **Sorenson CM, Barry MA, Eastman A.** Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 749-755.
- 176 **Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
- 177 **Li J, Eastman A.** Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na(+)/H(+)-antiport. *J Biol Chem* 1995; 270: 3203-3211.
- 178 **Takano YS, Harmon BV, Kerr JF.** Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J Pathol* 1991; 163: 329-336.
- 179 **Rajaratnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M, Clark-Lewis I.** Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 1994; 264: 90-92.
- 180 **Alam R.** Chemokines in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 273-277.
- 181 **Huang RP, Huang R, Fan Y, Lin Y.** Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem* 2001; 294: 55-62.

- 182 **Huang RP.** An array of possibilities in cancer research using cytokine antibody arrays. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 299-308.
- 183 **Fox FE, Capocasale RJ, Ford HC, Lamb RJ, Moore JS, Nowell PC.** Transforming growth factor-beta inhibits human T-cell proliferation through multiple targets. *Lymphokine Cytokine Res* 1992; 11: 299-305.
- 184 **Yoon SS, Ahn KS, Kim SH, Shim YM, Kim J.** In vitro establishment of cis-diammine-dichloroplatinum(II) resistant lung cancer cell line and modulation of apoptotic gene expression as a mechanism of resistant phenotype. *Lung Cancer* 2001; 33: 221-228.
- 185 **Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW.** Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-164.
- 186 **Fennell DA, Rudd RM.** Defective core-apoptosis signalling in diffuse malignant pleural mesothelioma: opportunities for effective drug development. *Lancet Oncol* 2004; 5: 354-362.
- 187 **Narasimhan SR, Yang L, Gerwin BI, Broaddus VC.** Resistance of pleural mesothelioma cell lines to apoptosis: relation to expression of Bcl-2 and Bax. *Am J Physiol* 1998; 275: L165-L171.
- 188 **Stewart JH 4th, Tran TL, Levi N, Tsai WS, Schrump DS, Nguyen DM.** The essential role of the mitochondria and reactive oxygen species in Cisplatin-mediated enhancement of fas ligand-induced apoptosis in malignant pleural mesothelioma. *J Surg Res* 2007; 141: 120-131.
- 189 **Kim KW, Mutter RW, Willey CD, Subhawong TK, Shinohara ET, Albert JM, Ling G, Cao C, Gi YJ, Lu B.** Inhibition of survivin and aurora B kinase sensitizes mesothelioma cells by enhancing mitotic arrests. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 1519-1525.

## I.- Tablas

<b>Tabla I: Estadios de Butchart</b>	
<b>Estadio I</b>	Infiltración de las pleuras parietal, visceral, mediastínica, diafragmática sin sobrepasarlas
<b>Estadio II</b>	Infiltración extrapleurales con afectación de estructuras mediastínicas y adenopatías intratorácicas
<b>Estadio III</b>	Infiltración de diafragma y peritoneo, afectación de la pleura contralateral, afectación de adenopatías extratorácicas
<b>Estadio IV</b>	Presencia de metástasis a distancia

<b>Tabla IIa: Clasificación de los mesoteliomas según el factor T (tumor primario) Clasificación del International Mesothelioma Interest Group [40]</b>	
<b>T1a</b>	Tumor limitado a la pleura parietal ipsilateral incluyendo la pleura mediastínica y diafragmática, sin afectación de la pleura visceral
<b>T1b</b>	Tumor que afecta a la pleura parietal ipsilateral, incluyendo la pleura mediastínica y diafragmática con focos de afectación en pleura visceral
<b>T2</b>	<p>Tumor que afecta a todas las superficies pleurales ipsilaterales (parietal, mediastínica, diafragmática y visceral) con al menos una de las siguientes características:</p> <p style="padding-left: 40px;">Afectación del músculo diafragmático. Tumor confluyente en la pleura visceral (incluyendo las cisuras) o extensión del tumor pleural al parénquima pulmonar subyacente</p>
<b>T3</b>	<p>Tumor localmente avanzado, pero potencialmente resecable. Tumor que afecta a todas las superficies pleurales ipsilaterales (parietal, mediastínica, diafragmática y visceral) con alguna de las siguientes características:</p> <p style="padding-left: 40px;">Afectación de la fascia endotorácica Extensión a la grasa mediastínica Focos solitarios, completamente resecables, de tumor que se extienden a los tejidos blandos de la pared torácica Afectación no transmural del pericardio</p>
<b>T4</b>	<p>Tumor localmente avanzado irresecable. Tumor que afecta todas las superficies pleurales ipsilaterales (parietal, mediastínica, diafragmática y visceral) con al menos alguna de las siguientes características:</p> <p style="padding-left: 40px;">Extensión difusa de masas multifocales de tumor en la pared torácica, con o sin destrucción costal Extensión transdiafragmática tumoral que afecta al peritoneo. Extensión del tumor a la pleura contralateral Extensión del tumor a uno o varios órganos mediastínicos Extensión del tumor a la columna vertebral Tumor que afecta la superficie interna del pericardio con o sin derrame pericárdico o tumor que afecta directamente al miocardio</p>

<b>Tabla IIb: Clasificación de los mesoteliomas según el factor N (ganglios linfáticos)</b> <b>Clasificación del International Mesothelioma Interest Group [40]</b>	
<b>NX</b>	No se pueden valorar los ganglios regionales
<b>N0</b>	Ausencia de metástasis en los ganglios regionales
<b>N1</b>	Metástasis en los ganglios broncopulmonares o hiliares ipsilaterales
<b>N2</b>	Metástasis en los ganglios subcarinales o mediastínicos ipsilaterales, incluyendo los ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral
<b>N3</b>	Metástasis en los ganglios mediastínicos contralaterales, de la cadena mamaria interna contralateral o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales

<b>Tabla IIc: Clasificación de los mesoteliomas según el factor M (metástasis)</b> <b>Clasificación del International Mesothelioma Interest Group [40]</b>	
<b>MX</b>	La presencia de metástasis a distancia no puede ser valorada.
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia.
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia.

<b>Tabla III: Estadios de los mesoteliomas Clasificación del International Mesothelioma Interest Group [40]</b>	
<b>Estadio</b>	
<b>Ia</b>	T1a N0 M0
<b>Ib</b>	T1b N0 M0
<b>II</b>	T2N0M0
<b>III</b>	Cualquier T3M0 Cualquier N1M0 Cualquier N2M0
<b>IV</b>	Cualquier T4 Cualquier N3 Cualquier M1

<b>Tabla IV: Características morfológicas y bioquímicas de la necrosis celular</b>
Afectación de un grupo celular amplio
Alteración de la permeabilidad de la membrana celular
Edema y aumento de tamaño de la célula
Condensación irregular de la cromatina
Degradación irregular del ADN
Ruptura de las estructuras citoplasmáticas
Ruptura de la membrana citoplasmática y desintegración celular
Liberación de enzimas proteolíticas
Reacción inflamatoria tisular
Imagen de banda continua en electroforesis en gel de agarosa

<b>Tabla V: Características morfológicas de la célula en apoptosis</b>
Disminución de volumen
Forma redondeada u oval
Condensación e invaginación del citoplasma
Engrosamiento del retículo endoplásmico
Alteración de los orgánulos citoplasmáticos
Disminución del tamaño del núcleo
Condensación de la cromatina en forma de semiluna
Fragmentación nuclear
Formación de cuerpos apoptóticos

**Tabla VI: Características bioquímicas de la apoptosis celular**

Precisa energía en forma de ATP
Deshidratación celular
Pérdida de la simetría de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática
Pérdida del potencial de membrana mitocondrial
Fragmentación regular del ADN por endonucleasas
Degradación proteolítica de la membrana nuclear
Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos o células próximas
Ausencia de inflamación tisular
Patrón en escalera en electroforesis en gel de agarosa

<b>Tabla VII: Técnicas para la determinación de apoptosis y muerte celular</b>	
<b>Método</b>	<b>Descripción</b>
Microscopía óptica	Cambios morfológicos: modificación de la forma y el tamaño celular
Microscopía electrónica	Cambios morfológicos: modificaciones ultraestructurales de mitocondrias, retículo endoplásmico, etc.
Electroforesis	Patrón en banda o en escalera por fragmentación del ADN
Técnica TUNEL	Adición enzimática de nucleótidos marcados a los grupos hidroxilo terminales de los fragmentos de ADN
Ioduro de propidio	Se introduce en las células por aumento de la permeabilidad de la membrana y tiñe los núcleos
Anexina V	Afinidad por la fosfatidilserina de la membrana celular. No difunde a través de la membrana

<b>Tabla VIII: Clasificación de las citocinas según su función</b>	
<b>Relacionadas con:</b>	
Inflamación	IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 y TNF- $\alpha$
Inmunidad celular	IL-2 e INF $\gamma$
Inmunidad humoral	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13
Homeostasis	IL-3, G-CSF, M-CSF y GM-CSF

<b>Tabla IX: Clasificación de las citocinas según su acción</b>	
<b>Autocrina</b>	Actúa sobre receptores de la propia célula que las sintetiza
<b>Paracrina</b>	Actúa en el entorno celular próximo al lugar de secreción
<b>Endocrina</b>	Actúa sobre órganos o tejidos distantes

<b>Tabla X: Clasificación de las citocinas según sus propiedades</b>	
<b>Pleitropía</b>	Una misma citocina puede realizar múltiples efectos biológicos sobre diferentes células
<b>Redundancia</b>	Varias citocinas pueden ejercer un mismo efecto sobre diferentes células
<b>Sinergismo</b>	Dos o más citocinas producen un efecto que se potencia al actuar conjuntamente
<b>Antagonismo</b>	Varias citocinas pueden inhibirse o bloquearse mutuamente

Tabla XI: Receptores de citocinas

Tipo de receptor	Características	Citocinas
Inmunoglobulinas	Poseen varios dominios extracelulares similares a los de las inmunoglobulinas	IL-1 e IL-16
Factores de crecimiento hematopoyético		IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, G-CSF y GM-CSF
Interferones	Presentan dos residuos de cisteína en su porción extracelular	INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ e INF- $\gamma$
Factores de necrosis tumoral	Poseen en el dominio extracelular varias secuencias, de aproximadamente 40 aminoácidos, ricas en cisteína	TNF- $\alpha$ y TNF- $\beta$
Quimiocinas		IL-8, RANTES y PAF
Factores de crecimiento transformador		TGF- $\alpha$ y TGF- $\beta$

<b>Tabla XII: Clasificación de las quimiocinas</b>			
<b>Quimiocinas <math>\alpha</math> o CXC</b>	Con secuencia ELR	IL-8, GRO $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ y ENA-78	Presentan actividad angiogénica y son potentes quimioatrayentes de los neutrófilos
	Sin secuencia ELR	IP-10 y SDF-1 $\alpha$ y $\beta$	Activan los linfocitos T y los monocitos y son angiostáticas
<b>Quimiocinas <math>\beta</math> o CC</b>		RANTES, eotaxina 1 y 2, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 y MIP-1 $\alpha$ y $\beta$	Quimiotácticas para los eosinófilos, los linfocitos T y los monocitos
<b>Quimiocinas <math>\gamma</math> o C</b>		Linfotactina y SCM-1	Inducen la activación de los linfocitos T, los mastocitos y las células NK
<b>Quimiocinas <math>\delta</math> o CX<sub>3</sub>C</b>		Flactalquina o neurotactina	Interviene en la quimiotaxis de los monocitos y los linfocitos T

<b>Tabla XIIIa: Citocinas relacionadas con la inflamación</b>			
<b>Citocina</b>	<b>Otras denominaciones</b>	<b>Características</b>	<b>Acción</b>
RANTES	CCL5	Proteína de 8 KDa que forma parte de la familia de IL-8	Quimioatrayente selectiva de los linfocitos T y los monocitos. Induce la proliferación y activación de células NK y CHAK
MCP-1	SCYA2, MCAF y CCL2	Polipéptido de 13 KDa formado por 76 aminoácidos que forma parte de la familia SIG	Activa el reclutamiento de monocitos en los focos inflamatorios
MCP-5	CCL12 y SCYA12	Péptido de 9,2 KDa que consta de 82 residuos de aminoácidos y forma parte de la familia de quimiocinas $\beta$ o CC	Potente quimioatrayente de los monocitos humanos y de los macrófagos peritoneales del ratón.
TIMP-1	CLGI y EPA	Peptidasa de 28 KDa que pertenece a la familia de las metaloproteinasas	Interviene en la degradación de la matriz extracelular. Posee actividad antiapoptótica

<b>Tabla XIIIb: Citocinas relacionadas con la inflamación</b>			
<b>Citocina</b>	<b>Otras denominaciones</b>	<b>Características</b>	<b>Acción</b>
MIP-1	CCL3 y CCL4	Citocina proinflamatoria secretada por los macrófagos	Activa los neutrófilos, basófilos y eosinófilos
MIP-2	CXCL2 y Gro- $\beta$	Citocina proinflamatoria secretada por los monocitos y los macrófagos	Quimiotáctica para los leucocitos PMN y las células hematopoyéticas
G-CSF		Glicoproteína producida por las células endoteliales, los fibroblastos y los monocitos	Interviene en la producción y regulación de los neutrófilos
IL-6	HGF y BSF2	Citocina proinflamatoria producida por los linfocitos T y B, los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales	Interviene en la activación de la fiebre y en la producción de proteínas de fase aguda

<b>Tabla XIIIc: Citocinas relacionadas con la inflamación</b>			
<b>Citocina</b>	<b>Otras denominaciones</b>	<b>Características</b>	<b>Acción</b>
IL-10	CSIF	Citocina antiinflamatoria producida por los monocitos y los linfocitos T y B	Induce la síntesis de IgG. Inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias. Tiene efectos antiproliferativos
IL-8	CXCL8	Citocina sintetizada por leucocitos, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales	Induce la quimioatracción, activación y degranulación de los neutrófilos en el foco inflamatorio
KC		Quimiocina descrita en el ratón que presenta la misma actividad que la IL-8	Actúa como quimioatrayente de neutrófilos ante un estímulo inflamatorio
sTNF-R		Complejos proteicos que se producen por degradación proteolítica de la porción extracelular de los receptores de membrana para el TNF	Bloquea el TNF e inhibe su actividad proinflamatoria sobre la célula

## **J.- Iconografía**

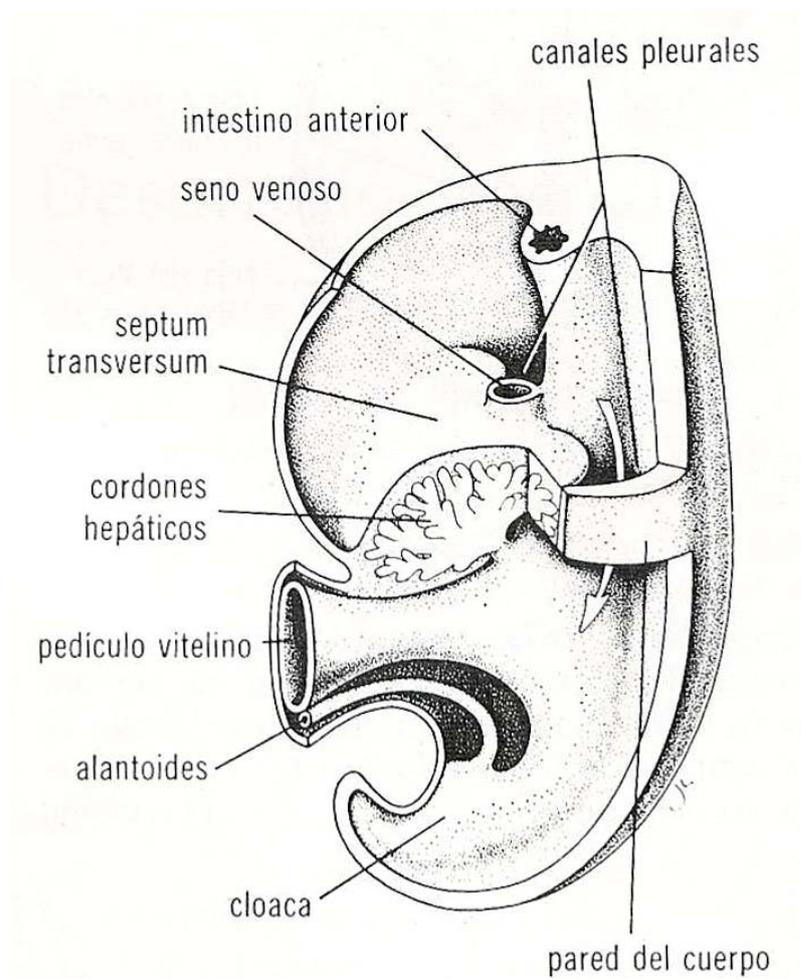


Figura 1: Formación de los canales pleurales primitivos. Tomado de Langman J. [13]

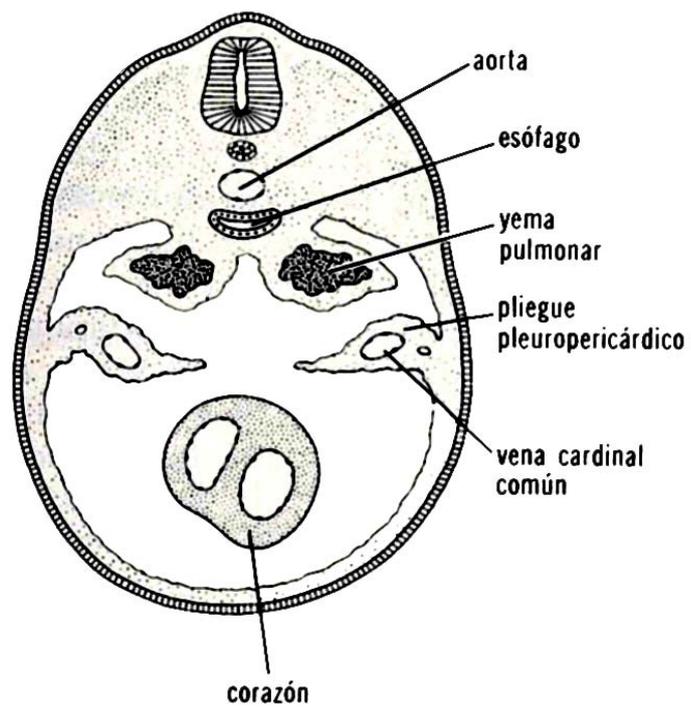


Figura 2: Transformación de los canales pleurales en las cavidades pleurales primitivas. Tomado de Langman J. [13]

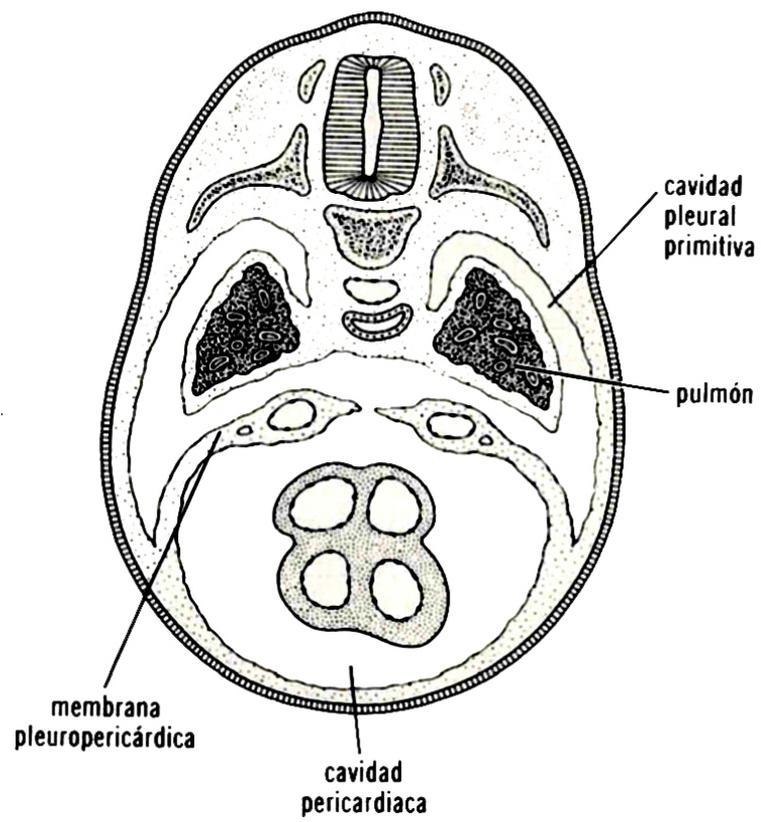


Figura 3: Formación de las cavidades pleurales primitivas. Tomado de Langman J. [13]

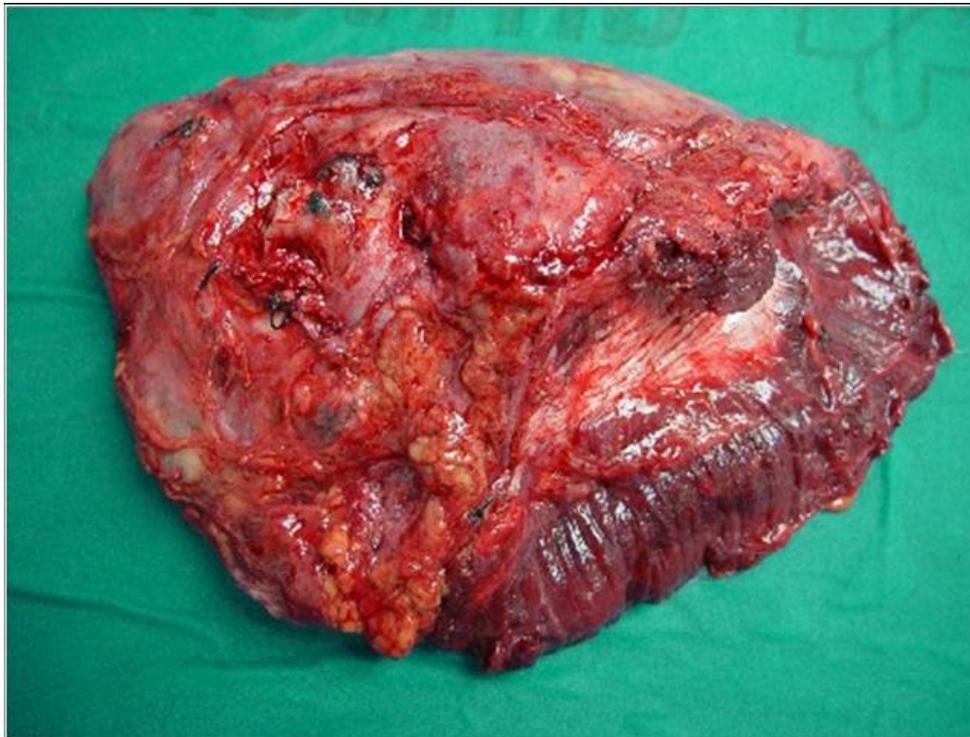


Figura 4: Mesotelioma pleural maligno

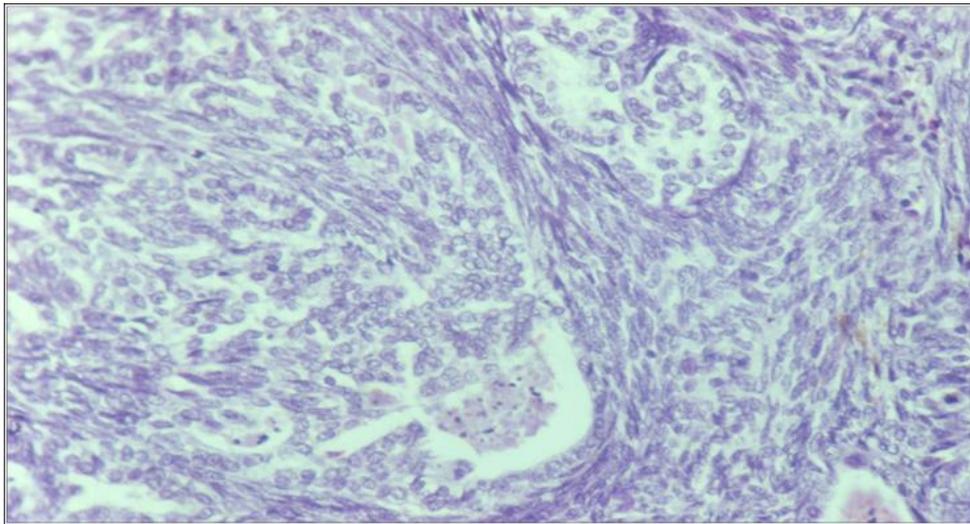


Figura 5: Características histológicas del mesotelioma pleural maligno

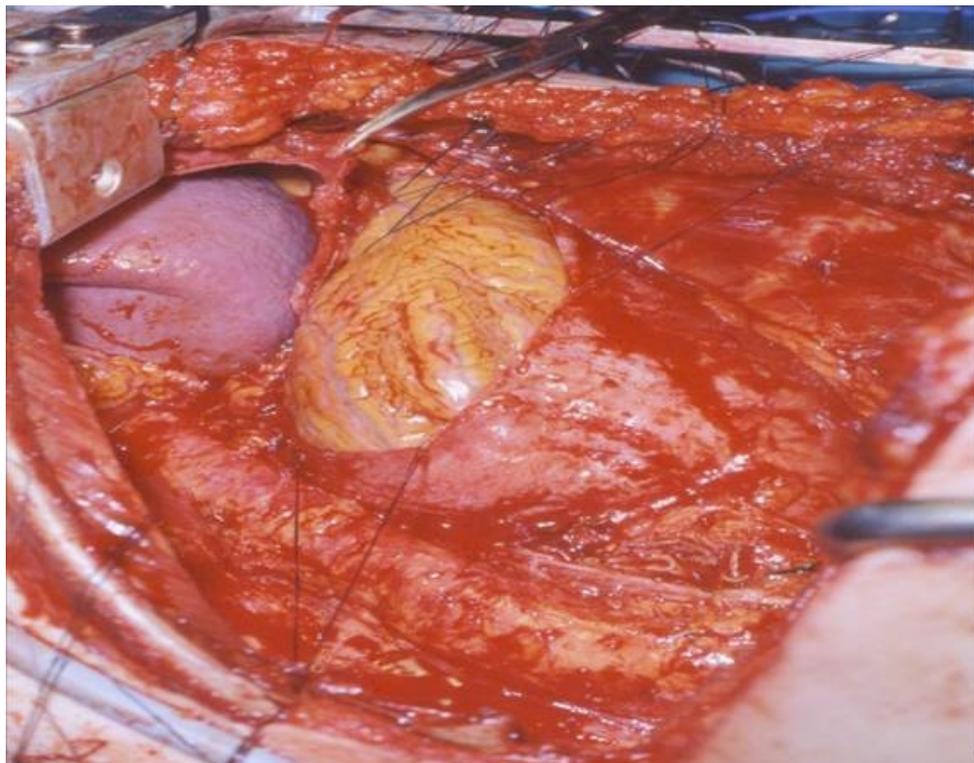


Figura 6: Tratamiento quirúrgico del mesotelioma pleural maligno

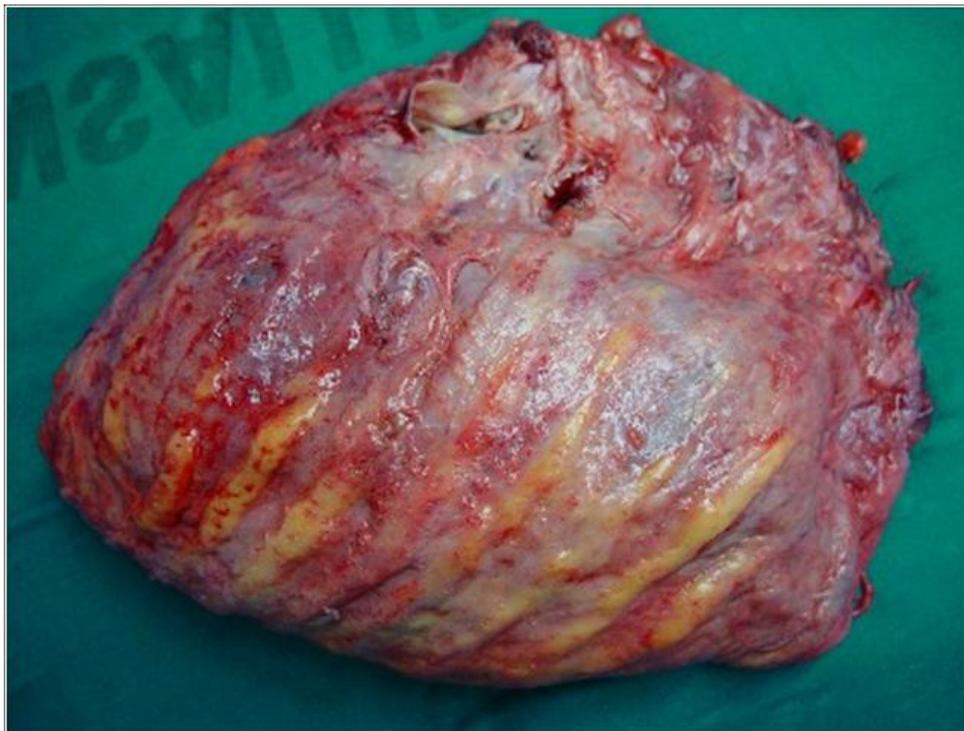


Figura 7: Pleuroneumectomía por mesotelioma pleural maligno

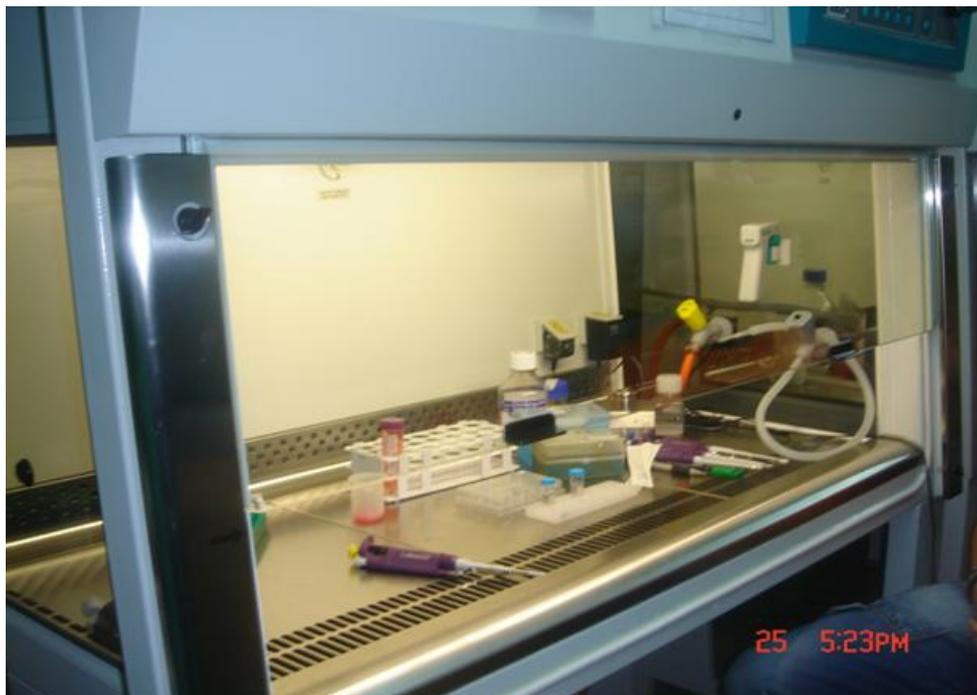


Figura 8: Campana para manipulación de muestras celulares

**RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc.**

Pos	Pos	Neg	Neg	6Ckine	CTACK	Eotaxin	GCSF	GM-CSF	IL-2	IL-3	IL-4
Pos	Pos	Neg	Neg	6Ckine	CTACK	Eotaxin	GCSF	GM-CSF	IL-2	IL-3	IL-4
IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40p70	IL-12p70	IL-13	IL-17	IFN- $\gamma$	KC	Leptin	MCP-1
IL-5	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40p70	IL-12p70	IL-13	IL-17	IFN- $\gamma$	KC	Leptin	MCP-1
MCP-5	MIP-1 $\alpha$	MIP-2	MIP-3 $\beta$	RANTES	SCF	sTNFR1	TARC	TIMP-1	TNF- $\alpha$	Trombopoietin	VEGF
MCP-5	MIP-1 $\alpha$	MIP-2	MIP-3 $\beta$	RANTES	SCF	sTNFR1	TARC	TIMP-1	TNF- $\alpha$	Trombopoietin	VEGF
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos
BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos

Figura 9: Determinaciones del *array* II de RayBiotech Inc.



Figura 10: FACScan para análisis de muestras celulares

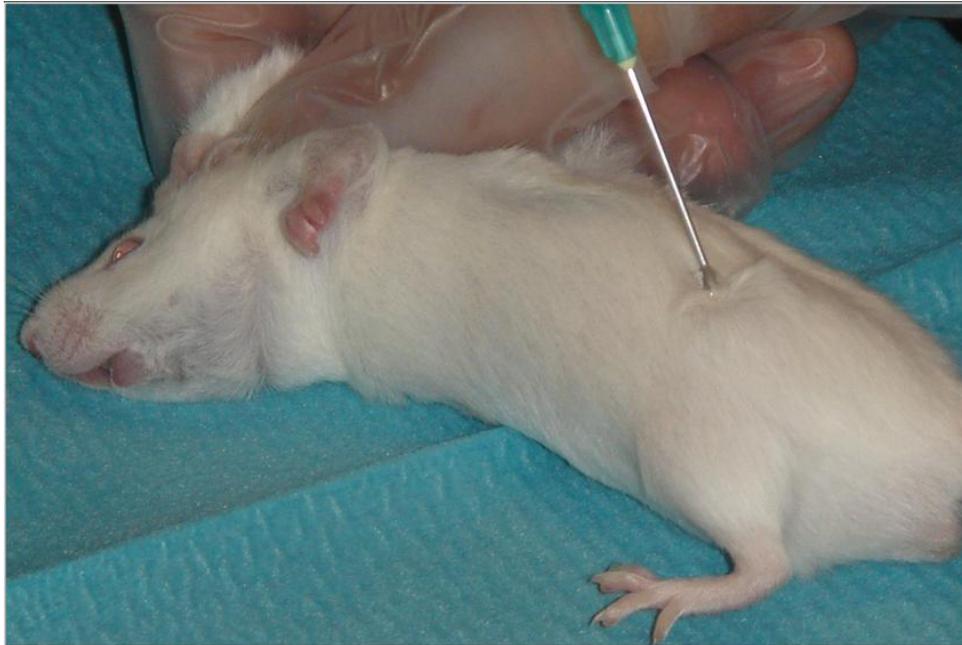


Figura 11: Procedimiento anestésico



Figura 12: Incisión cutánea de esternolaparotomía media



Figura 13: Apertura del peritoneo parietal

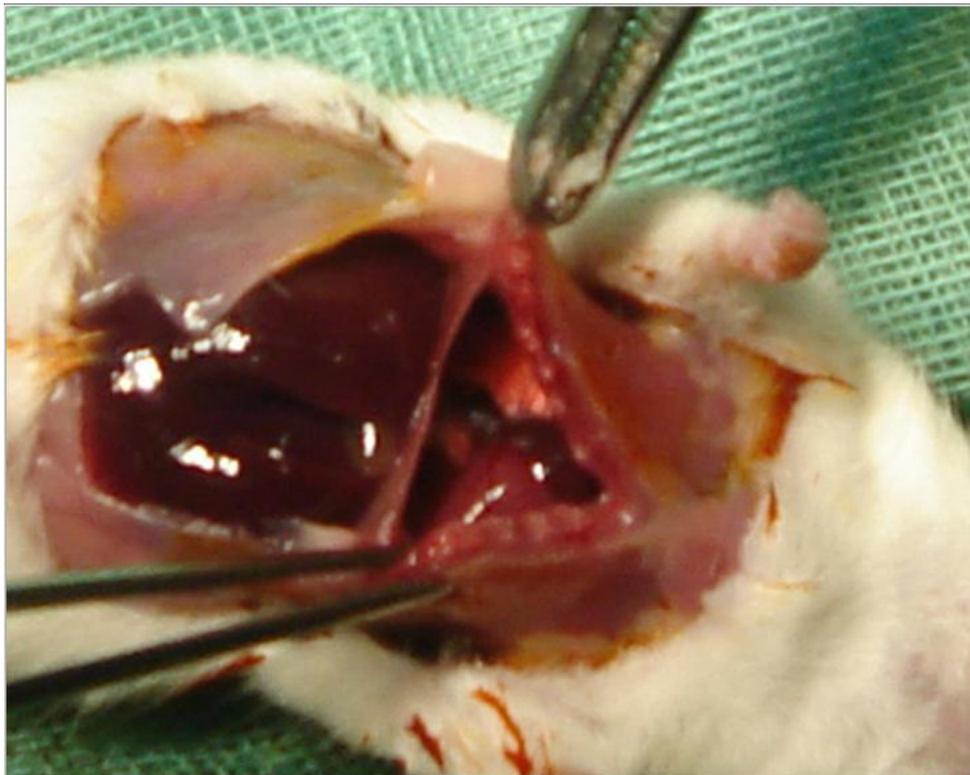


Figura 14: Apertura de la cavidad pleural derecha

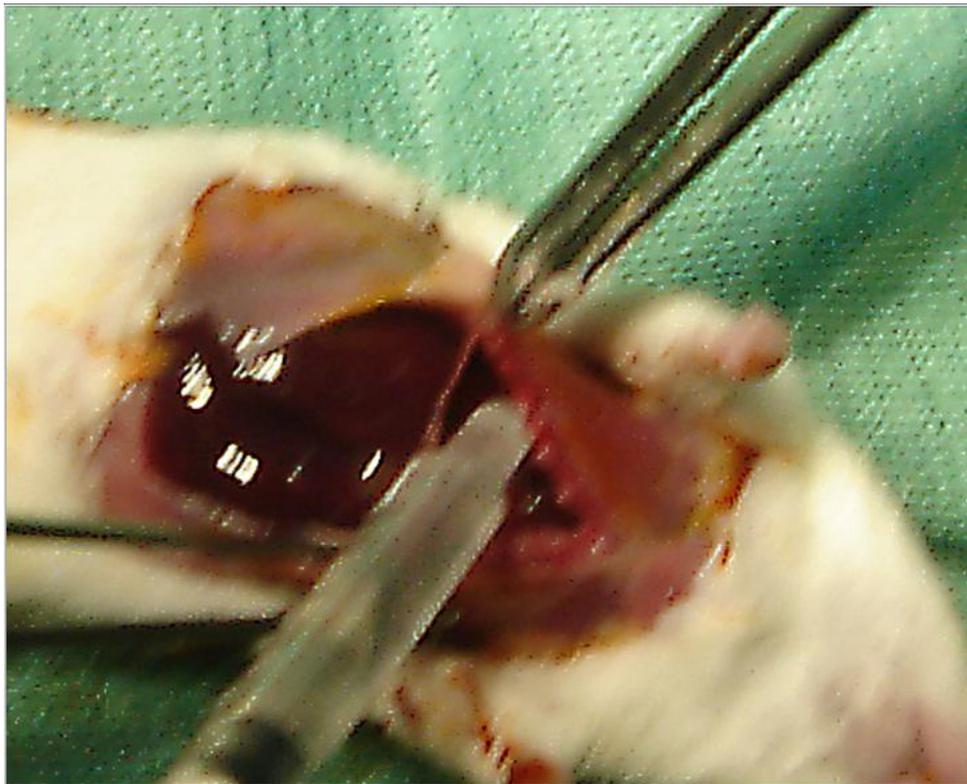


Figura 15: Instilación en la cavidad pleural de suero fisiológico tamponado con fosfato PBS 0,15 M

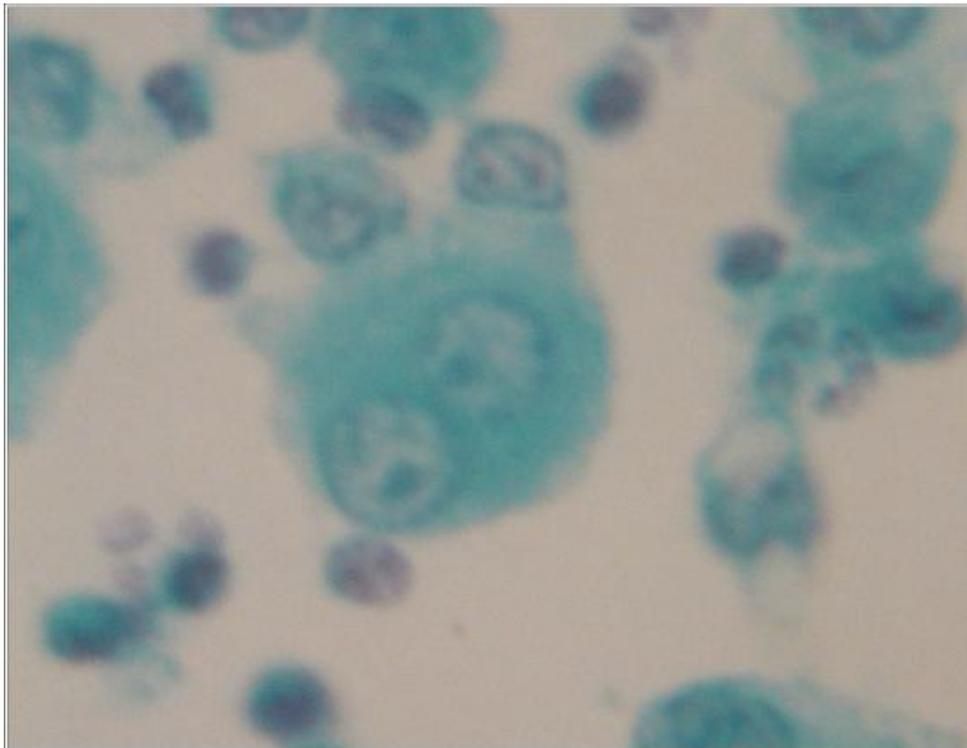


Figura 16: Células mesoteliales y macrófagos pleurales

<b>RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc.</b>	
<b>IL-8 (KC en ratón)</b>	<b>Quimiotáctica para polimorfonucleares</b>
<b>IL-6</b>	<b>Activa señalización de superficie celular</b>
<b>IL-10</b>	<b>Activa células “asesinas” y células T</b>
<b>RANTES</b>	<b>Pone en marcha inflamación modulada por células T</b>
<b>MCP-1</b>	<b>Quimiotáctica de linfocitos</b>
<b>MCP-5</b>	<b>Atrayente de monocitos y macrófagos</b>
<b>TIMP-1</b>	<b>Inhibidora de colagenasa degradadora matriz extracelular</b>
<b>sTNFR</b>	<b>Factor de necrosis tumoral. Proinflamatoria</b>
<b>MIP1</b>	<b>Actúa sobre fagocitos mononucleares y macrófagos</b>
<b>MIP2</b>	<b>Responsable de migración de neutrófilos</b>
<b>G-CSF</b>	<b>Estimula colonias de granulocitos</b>

Figura 17: Citocinas determinadas en el *array* utilizado en el estudio

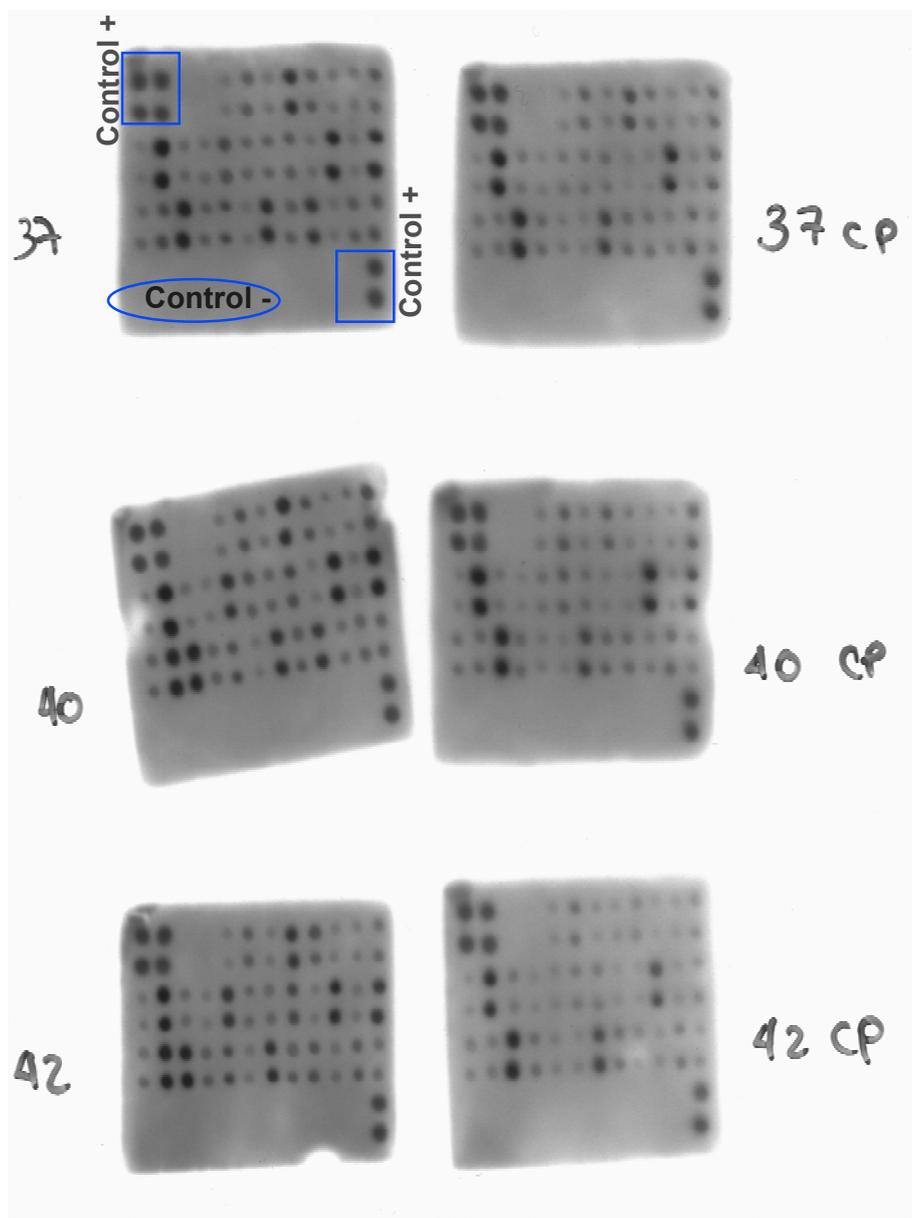


Figura 18: Películas autorradiográficas escaneadas por transparencia