

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
CÁTEDRA DE CIRUGÍA TORÁCICA

TESIS DOCTORAL

***EFFECTOS SOBRE LAS CÉLULAS PLEURALES
MALIGNAS DE LA HIPERTERMIA Y CISPLATINO:
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS PRO-INFLAMATORIAS
Y APOPTOSIS CELULAR***

María Begoña Gregorio Crespo

VALLADOLID 2015



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía, Oftalmología,
Otorrinolaringología y Fisioterapia

D. Mariano García-Yuste Martín, Catedrático de Cirugía Torácica de la facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

y

D. José María Matilla González, Profesor Asociado de Ciencias de la Salud de la facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

CERTIFICAN

Que el trabajo **“Efectos sobre las células pleurales malignas de la hipertermia y cisplatino: síntesis de proteínas pro-inflamatorias y apoptosis celular”**, realizado bajo su dirección por Dña. María Begoña Gregorio Crespo, 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 11 de Septiembre de 2015.

Prof. M. García-Yuste

Prof. José Mª Matilla

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA,
OTOLINGUISTICA,
OTORRINOLARINGOLOGIA
Y FISIOTERAPIA

Avda. Ramón y Cajal, 7
47005 VALLADOLID

Trabajo presentado por María Begoña Gregorio Crespo para optar al título de Doctora en Medicina y Cirugía

Realizado bajo la dirección de:

Dr. D. Mariano García-Yuste Martín

Dr. D. José María Matilla González

Valladolid 2015

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

La salud no lo es todo; pero sin ella, todo lo demás es nada.

Schopenhauer

Dedicatoria

A mi madre por TODO. Por ser quien es y por hacer de mí quien soy.
Sin ella nada habría sido posible.

A Ramón por ser luz en la oscuridad. Por su comprensión y su apoyo.
Y por traer a mi vida ilusión, felicidad y futuro.

A mi abuelo Julio César, emperador siempre en mi memoria y en mis
afectos.

Agradecimientos

Muy especialmente al Prof. Dr. D. Mariano García-Yuste Martín, figura crucial en mi formación como médico y como persona, además de principal responsable de la ejecución y consecución de este trabajo. Gracias por su ayuda en todos los ámbitos y por ser modelo y estímulo de constancia, trabajo y profesionalidad.

Al Prof. Dr. D. Guillermo Ramos Seisdedos, que me inició durante las clases en la Facultad en el mundo de la Cirugía Torácica. Gracias por ser posteriormente un accesible Jefe de Servicio en mi etapa MIR e inicialmente codirector de esta tesis doctoral.

Al Dr. D. José M^a Matilla González, que aceptó gustosamente ser codirector de esta tesis doctoral. Gracias por su complicidad, colaboración, amistad y por su contribución a mi formación quirúrgica y personal.

Al Dr. D. Félix Heras Gómez, que inició la investigación en la línea que ocupa este trabajo. Gracias por sus enseñanzas en mi formación como profesional sanitaria. Con cariño en el recuerdo.

A todos los profesionales del Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid, que han colaborado con profesionalidad y generosidad inmensas en la ejecución experimental de este trabajo y sin cuya ayuda no habría sido posible su realización. Especialmente a Yolanda Álvarez, Etzel Hugo y la Dra. Nieves Fernández-García.

A las doctoras Ángela Arévalo Pardal y Cristina García Rico, que me ayudaron en la realización de la fase experimental de este trabajo. Gracias por su colaboración, su compañerismo y su amistad.

Al Dr. Tomás Mate por su colaboración inestimable en el análisis estadístico de los resultados.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Torácica de Valladolid, por su buen hacer profesional y su calidad como personas. Gracias por tantos años de ayuda y apoyo, por todo lo que me han enseñado y por todo lo que me aportan cada día como profesional y como ser humano.

A los pacientes, que generosamente aceptaron colaborar en el estudio haciéndolo posible. Gracias por ser nuestro estímulo diario en esta complicada profesión. Gracias por impulsarnos a mejorar cada día con sus gestos de apoyo y agradecimiento.

A todas las personas, amigos y familia, que han contribuido a mi desarrollo como profesional y como ser humano. Gracias por su ayuda y apoyo constantes que han hecho que pueda llegar hasta aquí.

Al Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Valladolid, por hacer posible el desarrollo y presentación de este trabajo.

Índice

Índice	VI
Abreviaturas y Acrónimos	XI
Resumen	1
Abstract	4
Introducción	7
<i>1.-Derrame pleural maligno</i>	8
1.1.- Epidemiología	8
1.2.- Fisiopatología	9
1.3.- Clínica	10
1.4.- Diagnóstico	10
1.5.- Pronóstico	12
1.6.- Tratamiento	12
<i>2.-Nuevas terapias. Tratamientos intrapleurales</i>	14
2.1.- Desarrollo de la terapia intrapleural	14
2.2.- Inmunoterapia intrapleural	16
2.3.- Terapia génica intrapleural	18
2.3.1.- Terapia con vectores de transferencia génica	18
2.3.1.1.- Retrovirus	19
2.3.1.2.- Adenovirus	19
2.3.1.3.- Vectores no víricos	20
2.3.2.- Terapia con genes	20
2.3.2.1.- Terapia con genes suicidas	21
2.3.2.2.- Terapia con genes supresores de tumores	21
2.3.3.- Terapia con citoquinas	23
2.4.- Lesión celular asociada a la hipertermia. Hipertermia intracavitaria	23
2.5.- Quimioterapia intrapleural	25

<i>3.-Efecto de la hipertermia, de los citostáticos y de la quimioterapia hipertérmica a nivel local. Resultados de la quimioterapia hipertérmica intrapleural</i>	27
<i>4.- Estrategia terapéutica en la quimioterapia hipertérmica intrapleural. Inducción de apoptosis en células neoplásicas</i>	43
4.1.- Justificación de la investigación en quimioterapia hipertérmica Intrapleural	43
4.2.- Objetivos de la quimioterapia hipertérmica intrapleural. Inducción de apoptosis en las células neoplásicas	45
4.2.1.- El proceso de apoptosis celular y sus mediadores biomoleculares. Proteínas implicadas en el proceso apoptótico.	46
4.2.2.- Proteínas citoprotectoras. Proteínas de shock térmico	50
Planteamiento del tema	53
Hipótesis de trabajo	56
Pacientes y Métodos	58
<i>1.-Consideraciones previas y diseño del estudio</i>	59
<i>2.-Población de estudio</i>	60
2.1.- Criterios de inclusión	60
2.2.- Características de los pacientes	62
<i>3.-Metodología</i>	66
3.1.- Obtención de muestras. Recogida y preservación del líquido pleural	66
3.2.- Procesamiento de las muestras para estudio anatomopatológico en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valladolid	67
3.2.1.- Procesamiento del líquido pleural. Estudio citológico	67
3.2.2.- Procesamiento de las biopsias pleurales	68
3.3.- Procesamiento del líquido pleural para su estudio en el laboratorio de biología y genética molecular	68
3.3.1.- Procesado inicial de las muestras	69
3.3.2.- Procesado de muestras tras 24 horas de incubación	71
3.3.2.1- Señalización celular	71
3.3.2.2- Determinación de apoptosis	71

3.3.2.3.- Procedimientos de marcaje y tinción celular para su diferenciación y cuantificación de apoptosis	72
3.3.3.- Determinación de la expresión de proteínas implicadas en el proceso de apoptosis	73
4.- <i>Tratamiento estadístico</i>	75
Resultados	76
1.- <i>Consideraciones previas</i>	77
2.- <i>Determinación de la apoptosis celular</i>	78
3.- <i>Determinación de la expresión proteica en relación con la apoptosis de las células neoplásicas pleurales</i>	80
3.1.- Familia de proteínas Bcl-2	80
3.2.- Proteínas de choque térmico. Familia Hsp	84
3.3.- Otras proteínas relacionadas con la apoptosis	88
3.4.- Compendio de la variación en conjunto de las proteínas con acción proapoptótica	93
3.5.- Compendio de la variación en conjunto de las proteínas con acción antiapoptótica	97
3.6.- Compendio de la variación en conjunto de las proteínas con acción pro y antiapoptótica en relación con el tipo histológico tumoral	101
3.6.1.- Adenocarcinoma poco diferenciado	101
3.6.2.- Adenocarcinoma bien diferenciado	101
3.6.3.- Mesotelioma	102

Discusión	106
1.-¿Está justificada la investigación de la quimioterapia hipertérmica intrapleural? ¿Es necesario proseguir en la investigación de la misma?	107
2.-¿Es posible afirmar que la quimioterapia hipertérmica induce apoptosis en las células neoplásicas? ¿Podría por tanto considerarse que dicha terapia tiene el efecto esperado?	109
3.-¿Es la respuesta a la hipertermia y los citostáticos igual en todas las células neoplásicas? ¿Deberían plantearse diferentes esquemas terapéuticos dependiendo del tipo de neoplasia pleural?	112
4.-¿La hipertermia aislada es capaz de inducir apoptósis efectiva en las células tumorales? Si así fuera, ¿podría considerarse su establecimiento como terapia aislada?	115
5.-¿Son la temperatura de 40°C y el tiempo de aplicación de 2 horas adecuados? ¿Es posible establecer en este tipo de tratamiento una determinada temperatura y tiempo de exposición como los más idóneos?	118
6.-¿Es adecuada la elección del cisplatino como agente citostático? ¿Deberían considerarse otros fármacos o asociaciones de ellos en este tipo de tratamiento? ¿Resulta efectiva la dosis de cisplatino empleada?	120
7.-¿Es posible establecer en la actualidad un protocolo de tratamiento intrapleural en las neoplasias localizadas a este nivel?	124
Conclusiones	126
Bibliografía	130
Anexos	142
Tablas	149
Figuras	152

Abreviaturas y Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleic
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Bcl	B cell leukemia
BSA	Bovine seric albumin
BTS	British Thoracic Society
CARD	Caspase recruitment domain
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DCC-E1A	E1A gene complexed with DC-Chol cationic liposome
DC-SIGN	Dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin
DED	Death-effector domain
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ECOG	Eastern cooperative oncology group

FADD	Fas-associated death domain
FBS	Fetal bovine serum
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
Hsp	Heat shock proteins
HSVtk	Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase
HtrA2/Omi	HtrA (high-temperature requirement) Serine Peptidase 2
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
IBGM	Instituto de biología y genética molecular
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
INF-α	Interferón alfa
INF-γ	Interferón gamma
LCSG	Lung cancer study group

MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2
MPTPC	Mitochondrial permeability transition pore complex
PBS	Phosphate buffered saline
rAd-p53	Recombinant adeno-viral vector encoding wild-type p53 gene
Rantes	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RBC (lysis buffer)	Red blood cell (lysis buffer)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
si-RNA	Small interfering ribonucleic acid
Smac/Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low Pi
sTNFR	Soluble tumor necrosis factor receptor
TC	Tomografía computarizada
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	Vascular endothelial growth factor

wt-p53

Wild-type p53 gene

XIAP

X-linked inhibitor of apoptosis

5-FU

5 fluorouracilo

Resumen

En razón de su elevada incidencia y mal pronóstico, la infiltración neoplásica maligna de la pleura supone un importante reto terapéutico en la actualidad, dado que los resultados de los tratamientos disponibles son pobres y en la mayor parte de los casos únicamente implican el control de síntomas. El empleo de la quimioterapia hipertérmica intrapleural podría aportar un mejor control de la enfermedad mejorando la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

A pesar de que en los últimos años se han realizado numerosos ensayos de este tipo de tratamiento, sus mecanismos de acción aún no se han aclarado y no es posible establecer, con suficiente evidencia científica, un esquema terapéutico concreto. Teniendo en cuenta la escasa información existente acerca del mecanismo de acción de la quimioterapia hipertérmica a nivel celular se planteó el presente estudio, con el fin de determinar *in vitro* en células pleurales neoplásicas humanas, el efecto de la hipertermia y el cisplatino en términos de apoptosis celular.

Las células empleadas en el estudio fueron tomadas del líquido pleural de pacientes con infiltración pleural neoplásica confirmada histológicamente, a los que se realizó una videotoracoscopia diagnóstica. Como control, se utilizaron células obtenidas del líquido pleural de pacientes afectados de procesos pleurales de naturaleza inflamatoria. Tras la diferenciación en el laboratorio de las células neoplásicas y no neoplásicas presentes en las muestras, se procedió a determinar el porcentaje de apoptosis celular en ambos grupos tras 2 horas de exposición a cisplatino bajo diversas condiciones de temperatura: 37°C, 40°C y 42°C. Así mismo se analizaron las variaciones en la expresión de las principales proteínas implicadas en el proceso apoptótico, producidas por la hipertermia y el citostático en las células pleurales neoplásicas.

El efecto aislado de la hipertermia, evidenció inducción de apoptosis en las células inflamatorias pero no así en las células neoplásicas. Se apreció un incremento significativo de la apoptosis en ambos grupos celulares tras el efecto combinado de la hipertermia y el citostático. El porcentaje más elevado de apoptosis en las células neoplásicas, se obtuvo tras la administración de cisplatino a una temperatura de 40°C.

En lo que respecta a las variaciones en la expresión de proteínas implicadas en el proceso apoptótico, el análisis evidenció cambios ostensibles en la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas, registrándose los cambios más importantes en la expresión de las mismas tras el efecto combinado de la hipertermia y el cisplatino. También pudieron apreciarse diferentes respuestas en la expresión proteica en función del tipo histológico tumoral de las células estudiadas.

Los resultados de nuestro estudio permiten afirmar que el efecto combinado del cisplatino y la elevación de la temperatura del medio a 40°C durante un tiempo de aplicación de 2 horas, produce *in vitro* apoptosis efectiva en células pleurales neoplásicas humanas.

Abstract

Because of its high incidence and bad prognosis, nowadays malignant pleuritis means a significant therapeutic challenge as the results of the available treatments are poor and in many cases only achieve the control of symptoms. The use of intrapleural hyperthermo-chemotherapy could provide a better control of the disease with an improvement of survival rate and quality of life in these patients.

Despite extensive clinical research mechanism of action of intrapleural hyperthermo-chemotherapy remains unclear, so the establishment of an optimal protocol for this treatment currently is not possible. Therefore the purpose of our study was to determine the response of the malignant pleural human cells to the application of hyperthermia versus hyperthermia plus cisplatin, in terms of cell apoptosis.

Pleural tumor cells collected from the pleural effusion of patients with histological confirmation of malignant pleural disease who underwent diagnostic videothoracoscopy, were analyzed. As control sample pleural cells collected from the pleural effusion of inflammatory lesions were used. Pleural human cells were cultured during 120 minutes under different temperature conditions: 37 °C, 40 °C and 42 °C, with and without the addition of cisplatin. After cell differentiation (malignant versus non-malignant), the determination of cell apoptosis in the two populations was carried out. In addition, some apoptosis proteins were determined in the supernatant of the cellular culture.

For the inflammatory cells significant statistical differences were reached for the hyperthermia alone and hyperthermia plus cisplatin. For the malignant cells, statistical differences were reached for the application of hyperthermia plus cisplatin, not for the hyperthermia alone. For the malignant cells, we found the maximum effect in induction of cell apoptosis, for the addition of cisplatin at a temperature of 40°C.

For the variations in the apoptosis proteins expression, we found evident changes after the synergic action of hyperthermia and cisplatin. We also determined different responses associated to the diverse histological types.

ABSTRACT

The results of this study allows us to affirm that *in vitro*, the synergic action of a temperature of 40°C and cisplatinum during 2 hours of application, increase cell apoptosis in pleural malignant human cells.

Introducción

1. Derrame pleural maligno

1.1.- Epidemiología

A excepción de las enfermedades cardiovasculares, las neoplasias malignas son la causa más común de fallecimiento en la población menor de 65 años en la mayor parte de los países desarrollados. La práctica totalidad de ellas pueden afectar a la pleura en sus estadios avanzados, originando una pleuritis carcinomatosa y derrame pleural maligno asociado ¹.

El derrame pleural maligno constituye en la actualidad un importante desafío diagnóstico y terapéutico, así como un problema de salud pública de gran relevancia, dado que contribuye de forma significativa al deterioro de la capacidad funcional respiratoria y la calidad de vida de los pacientes afectados. Su incidencia en los Estados Unidos de América se estima en 150.000 a 175.000 casos / año, mientras que en Europa ésta se aproxima a los 400.000 casos / año ^{1,2}.

Dicha entidad es un signo de enfermedad maligna avanzada o diseminada, frecuentemente concomitante con el proceso neoplásico primitivo, y a la que deben enfrentarse con frecuencia, neumólogos, oncólogos y cirujanos torácicos. Este tipo de derrame suele aumentar y recidivar de forma rápida, acompañándose en la mayor parte de los casos de repercusión clínica respiratoria importante: disnea, tos y dolor torácico ².

En cuanto a la neoplasia primitiva originaria de la afectación pleural, el carcinoma broncogénico, debido a la gran proximidad anatómica de los pulmones a la pleura, es la causa más frecuente de derrame pleural maligno.

Aproximadamente el 30% de los pacientes diagnosticados de una neoplasia pulmonar primitiva desarrollan derrame pleural y de la totalidad de derrames pleurales malignos diagnosticados casi el 40% son secundarios a un carcinoma broncogénico, principalmente en el caso del adenocarcinoma.

La segunda causa en frecuencia de derrame pleural maligno son los carcinomas mamarios, constituyendo aproximadamente el 25% del total de los casos, seguidos del linfoma (10%), carcinomas ováricos (5%) y neoplasias gastrointestinales (5%)^{1,2}.

Así mismo, la presencia de derrame pleural se asocia frecuentemente al mesotelioma pleural maligno difuso. La incidencia a nivel mundial de esta neoplasia es de unos 2.000 a 3.000 casos nuevos al año, siendo habitual la exposición previa del paciente al asbesto. Su carácter agresivo condiciona un mal pronóstico, oscilando la mediana de supervivencia entre 4 y 12 meses cuando no es posible la realización de un tratamiento con intención curativa³.

1.2.- Fisiopatología

En el caso del carcinoma broncogénico, la diseminación hematógica de las células tumorales a la pleura visceral permite la migración de las mismas a la pleura parietal mediante adherencias preexistentes. Los carcinomas mamarios pueden originar afectación ipsilateral mediante metastatización a través de los vasos linfáticos de la pared torácica, así como afectación bilateral o contralateral secundaria a diseminación hematógica por vía hepática. Los linfomas tipo Hodgkin generalmente provocan obstrucción linfática, mientras que los linfomas no Hodgkin suelen invadir la pleura de manera directa².

Los derrames pleurales malignos hemorrágicos pueden surgir por invasión directa de los vasos sanguíneos por el tumor o por el desarrollo de una angiogénesis tumor inducida. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), es una citoquina producida por multitud de tumores que participa en la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Parece que el VEGF podría estar implicado en la patogénesis de los derrames pleurales malignos, mostrando los resultados de algunos estudios que el nivel de VEGF en líquido pleural podría ser un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad¹.

1.3.- Clínica

Aunque no todos los pacientes afectados por un derrame pleural maligno desarrollan síntomas, en la mayor parte de los casos asocian manifestaciones clínicas diversas que frecuentemente condicionan de forma importante su calidad de vida².

La disnea es el síntoma que presenta una mayor incidencia debido a la disminución de la compliance de la pared torácica, así como al descenso del hemidiafragma ipsilateral, la reducción del volumen pulmonar y el desplazamiento mediastínico asociados. Otros síntomas que suelen desarrollar estos pacientes son: dolor torácico, tos, malestar general, hiporexia y pérdida de peso⁴.

1.4.- Diagnóstico

No todos los derrames pleurales presentes en pacientes con enfermedad neoplásica pueden ser filiados como malignos, ya que es posible encontrar derrames pleurales *paramalignos* en estos enfermos.

En este tipo de derrames el mecanismo de aparición no es la infiltración de la pleura por el proceso neoplásico, sino otro tipo de alteraciones como: obstrucción del conducto torácico, obstrucción bronquial y atelectasia pulmonar asociada, efecto secundario de tratamientos con quimioterapia y/o radioterapia, neumonía o embolismo pulmonar. En estos derrames no se objetiva la presencia de células tumorales en el líquido pleural².

El diagnóstico concluyente de derrame pleural maligno sólo puede realizarse mediante la evidencia citológica o histológica de células neoplásicas malignas. Por tanto, es necesario identificar la presencia de dichas células en el fluido pleural (citología de líquido pleural) o en la serosa pleural (biopsia pleural)^{1,2}.

La rentabilidad diagnóstica basada en el hallazgo de células malignas en la citología de líquido pleural varía entre un 50% y un 90%, dependiendo dicho porcentaje de la experiencia del examinador, la extensión del tumor y el tipo de muestra empleada para el diagnóstico.

La exactitud diagnóstica puede incrementarse en gran medida con el estudio de muestras tisulares (fragmentos de pleura) obtenidas principalmente mediante biopsia bajo visión directa videotoracoscópica. Además, con este tipo de muestras es posible realizar no sólo el diagnóstico etiológico, sino también algunas determinaciones inmunohistoquímicas y genéticas que pueden ayudar a mejorar el esquema terapéutico a seguir en estos pacientes¹.

A pesar del empleo de las técnicas mencionadas, existen un 5% a 10% de casos de derrame pleural maligno en los que no resulta posible llegar a un diagnóstico exacto y concluyente de la neoplasia que los ha originado¹.

1.5.- Pronóstico

En la actualidad el diagnóstico de derrame pleural maligno de origen metastásico implica la práctica imposibilidad de realizar un tratamiento del mismo con intención curativa⁵. La evidencia de células neoplásicas malignas en el líquido pleural y/o en la biopsia pleural, implica la presencia de enfermedad avanzada o diseminada que se asocia a una esperanza de vida reducida. En efecto, la mediana de supervivencia tras el diagnóstico de afectación pleural maligna oscila entre los 3 y los 12 meses, dependiendo del estadio y del tipo histológico del tumor primitivo⁴.

En conjunto, el pronóstico de los pacientes con carcinomatosis pleural es malo, presentando una tasa media de supervivencia a un año cercana al 18%. En los casos asociados a carcinoma broncogénico y a algunas neoplasias del tracto gastrointestinal (estómago), la tasa de supervivencia resulta significativamente más corta. Por contra, en el caso del carcinoma mamario la supervivencia puede ser mayor en varios meses o incluso años¹.

En lo que respecta al derrame pleural maligno asociado al mesotelioma pleural, la existencia o no de éste acompañando a la proliferación neoplásica de la pleura, no parece representar un factor con clara significación estadística en la previsión del pronóstico.

1.6.- Tratamiento

En la actualidad el derrame pleural maligno supone un reto terapéutico por la escasa posibilidad de lograr el control de la diseminación de un proceso neoplásico primitivo o metastásico en la pleura.

Este es el motivo por el que la mayor parte de los tratamientos empleados se centran más en la paliación y el control de los síntomas que en la curación y erradicación del proceso², intentando aportar a los pacientes una calidad de vida lo más prolongada posible y con el mínimo de efectos secundarios asociados⁴.

Los tratamientos paliativos o de control de síntomas que se emplean en la actualidad son diversos, dependiendo su elección de diferentes factores como el estado general del paciente, la intensidad y tipo de clínica presente, la respuesta del tumor a tratamientos sistémicos o el grado de re-expansión pulmonar tras la evacuación del derrame. En la guía de manejo del derrame pleural maligno de la sociedad británica del tórax (BTS) publicada en el año 2010, las alternativas terapéuticas consideradas son: la observación, las toracocentesis evacuadoras repetidas, el drenaje pleural, la pleurodesis (a través de drenaje o mediante videotoracoscopia) y la colocación de un catéter pleural tunelizado permanente⁴.

Recientemente otros estudios añaden a los procedimientos citados la consideración del empleo de nuevas terapias oncológicas locales a nivel intrapleural^{1,2}.

En pacientes con deterioro importante del estado general y/o estimación de un tiempo de supervivencia no superior a 3 meses, estaría aconsejada, en razón de su carácter mínimamente invasivo, la realización de punciones evacuadoras de repetición. En los pacientes con afectación general moderada o leve y supervivencia estimada más prolongada, se deberá considerar la colocación de un drenaje pleural.

Cuando el estado general y funcional del paciente lo permitan, debería ser valorada la realización de una videotoracoscopia. Con esta técnica, se posibilitará la evacuación del derrame, la realización de biopsias de la pleura bajo visión directa y la realización de pleurodesis. Los efectos adversos de esta técnica son escasos y en general leves.

En los casos en los que no sea posible una expansión pulmonar completa tras la evacuación del derrame, la pleurodesis raramente resultará efectiva y la persistencia del derrame podría obligar a la instauración de un catéter pleural permanente^{1,2,4}.

La realización de pleurectomía o decorticación, supone un planteamiento terapéutico con aceptación amplia para el tratamiento multimodal con intención curativa del mesotelioma pleural maligno en sus estadios precoces. Por el contrario, en el derrame pleural de origen metastásico no existen estudios con nivel de evidencia suficiente para justificar su realización^{1,2}.

2.- Nuevas terapias. Tratamientos intrapleurales

2.1.- Desarrollo de la terapia intrapleural

En razón de lo expuesto, actualmente el tratamiento de las enfermedades malignas primitivas y metastásicas de la pleura se ve seguido en general de resultados escasos y poco satisfactorios.

La exéresis quirúrgica de la afectación pleural tan solo estaría indicada en los procesos primitivos y limitada a los estadios iniciales de estas neoplasias. En todo caso dicha terapia únicamente se encuentra justificada en el contexto de un tratamiento multimodal.

En el caso de la afectación pleural metastásica, el rendimiento de los tratamientos oncológicos sistémicos disponibles resulta muy escaso y la citorreducción mediante técnicas quirúrgicas, en principio, no estaría indicada.

Por estos motivos se hace necesaria la investigación de nuevas modalidades terapéuticas, que deberán centrar su objetivo en la erradicación de las células tumorales pleurales y la posible infiltración tisular subyacente, consiguiendo así un mejor control del proceso con el consecuente aumento de la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes.

En el caso que nos ocupa resulta un factor determinante el hecho de que la enfermedad maligna se desarrolla en una cavidad fácilmente accesible a la exploración, toma de biopsias y estudio repetido del líquido pleural. Por todo ello la seguridad, eficacia y respuesta celular asociadas a las terapias intrapleurales pueden ser fácilmente analizadas y evaluadas. En este sentido las neoplasias pleurales presentan características que las hacen dianas muy atractivas para este tipo de abordaje, especialmente en el caso del mesotelioma pleural maligno, ya que su morbimortalidad está ligada a su agresividad local más que a la diseminación a distancia⁵.

El concepto de terapia intrapleural en el tratamiento de las neoplasias pleurales, surge inicialmente al observarse una mejor supervivencia en los pacientes sometidos a cirugía de exéresis por carcinoma broncogénico que desarrollaron un empiema en el periodo postoperatorio. A principios de los años 70 se postuló la teoría de que el ambiente inflamatorio local secundario al empiema, generaba una respuesta inmune antitumoral que mejoraba el control de la enfermedad y por tanto la supervivencia del paciente. En este sentido el espacio pleural se convierte, de manera teórica, en un lugar ideal para la inducción de una amplia variedad de respuestas antitumorales frente al proceso neoplásico⁵.

Basándose en dicho supuesto, diferentes grupos de investigación realizaron experimentos sustentados en la hipótesis de que la instilación intrapleural del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) podría iniciar una respuesta inmune inespecífica capaz de generar efectos antitumorales semejantes a los producidos por el empiema, pero evitando las complicaciones asociadas a una infección pleural grave. A pesar de que uno de estos estudios concluyó que una dosis única de BCG intrapleural tras la resección quirúrgica de carcinoma broncopulmonar mejoraba la supervivencia en estadio I de la enfermedad, dicho resultado no resultó corroborado por otros estudios randomizados posteriores en los que se incluyó a un mayor número de pacientes.

Sin embargo, la importancia de este tipo de ensayos radica en que sentaron la base de que el espacio pleural es una localización ideal para la administración eficaz y segura de nuevos agentes terapéuticos, promoviendo las investigaciones actuales centradas en la inmunoterapia, la terapia génica y la administración de agentes citotóxicos en la cavidad pleural⁵.

2.2.- Inmunoterapia intrapleural

El efecto terapéutico de la inmunoterapia en neoplasias malignas como el melanoma o el carcinoma de células renales es sobradamente conocido. En estas enfermedades citoquinas exógenas, anticuerpos monoclonales y vacunas anti-tumor, han contribuido a la inducción de una respuesta antitumoral efectiva.

En el caso del mesotelioma pleural maligno también ha sido ensayada la terapia inmune, a pesar de la constatación de un microambiente tumoral significativamente inmunosupresor⁵. Además de los mecanismos innatos del tumor para la evasión del sistema inmune, los pacientes afectados de mesotelioma pleural maligno presentan anomalías de la inmunidad humoral y mediada por células, defectos en la función celular de macrófagos y células NK y alteraciones de la toxicidad celular anticuerpo-dependiente mediada por células.

No obstante existe la creencia de que niveles elevados a nivel local de determinadas citoquinas proinflamatorias podrían vencer la resistencia inmune innata asociada al mesotelioma pleural maligno, por lo que se han llevado a cabo múltiples ensayos clínicos de infusión intrapleural de diversas citoquinas - interleuquina 2 (IL-2), interferón alfa (INF- α) e interferón gamma (INF- γ) -, pudiendo apreciarse diversos grados de regresión tumoral^{6,7}.

En este sentido los estudios más prometedores son los dirigidos por Boutin^{8,9} evaluando la actividad del INF- γ en pacientes afectados de mesotelioma pleural maligno, constatándose una toxicidad mínima y la presencia de respuesta completa (confirmada mediante videotoracoscopia) en algunos pacientes que presentaban enfermedad en estadio IA. La dificultad para el uso clínico del INF- γ en Europa ha limitado el desarrollo de más estudios en esta línea.

Yanagawa¹⁰ también empleó el INF- γ en pacientes que presentaban derrame pleural maligno secundario a carcinoma broncogénico, observando aclaramiento completo de las células tumorales en el líquido pleural en algunos casos, así como respuesta radiológica parcial, sin que se notificase toxicidad alguna.

Goey¹¹ estudió el efecto de la instilación de IL-2 diariamente durante 14 días en 23 pacientes con mesotelioma pleural maligno en estadios I-IIA, observando una respuesta parcial en el 19% de los pacientes, sin apreciarse en ningún caso respuesta completa. La toxicidad detectada consistió fundamentalmente en la aparición de fiebre y eosinofilia.

Sartori y colaboradores¹² llevaron a cabo un ensayo clínico prospectivo y randomizado, en el que comparaban el efecto de los citostáticos intrapleurales y la inmunoterapia intrapleural. 160 pacientes con derrame pleural maligno recidivante fueron randomizados para recibir bleomicina intrapleural (n=83) o interferón alfa-2b (n=77), administrándose una dosis única de bleomicina de 0.75 mg/Kg de peso y un millón de unidades por cada 10 Kg de peso de interferón alfa-2b, en 6 ciclos con un intervalo de 4 días. La respuesta a los 30 días fue del 84.3% para la bleomicina y del 62.3% para el interferón (p=.002) y el tiempo medio de progresión fue de 93 días para el grupo de la bleomicina y de 59 días para el grupo del interferón (p<.001), sin apreciarse diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia. Dichos resultados sugieren que la quimioterapia intrapleural con bleomicina es más eficaz en el control del derrame pleural maligno que la inmunoterapia intrapleural con interferón alfa-2b, en lo que a la paliación y control de síntomas se refiere, si bien dichos resultados podrían atribuirse al efecto de pleurodesis inducido por la bleomicina, más que a un efecto citotóxico en las células tumorales pleurales.

Además de los estudios con agentes inmunomoduladores específicos que han sido comentados, existen otras líneas de investigación en las que se trata de generar una respuesta inmune antitumoral en el espacio pleural empleando agentes inmunoestimuladores inespecíficos. Algunos de estos agentes activadores de la inmunidad incluyen superantígenos bacterianos inactivados procedentes de *Streptococcus* (OK-432) o de *Staphylococcus* (SSAg). En estos casos no se han objetivado respuestas citológicas favorables con el empleo del OK-432¹³ aunque si se han registrado resultados satisfactorios, en lo que al control de síntomas se refiere, así como una discreta mejoría de la supervivencia, tras la administración SSAg¹⁴.

2.3.- Terapia génica intrapleural

Los avances en genética molecular y tecnología de transferencia génica han facilitado el desarrollo de esta terapia consistente en la modificación de la estructura génica de las células con fines terapéuticos. En la actualidad, el concepto de terapia génica abarca el tratamiento de cualquier estado fisiopatológico basado en la transferencia de material genético, incluyendo ADNcomplementario (cDNA), genes completos, ARN interferente de pequeño tamaño (si-RNA), oligonucleótidos y células modificadas genéticamente⁵.

La terapia génica en el espacio pleural ofrece múltiples ventajas potenciales, relacionadas con el hecho de que el espacio pleural presenta una amplia superficie tapizada por una fina capa de mesotelio. Ello supone una configuración ideal para una transferencia génica eficiente mediante la instilación de líquidos o células en suspensión en el interior de la cavidad pleural. Además el acceso a la cavidad pleural es sencillo y seguro y, al contrario de lo que ocurre en la cavidad peritoneal en la que el desarrollo de adherencias e inflamación puede originar complicaciones severas, la sínfisis del espacio pleural no supone un problema, resultando de hecho en muchos casos, deseable⁵.

2.3.1.- Terapia con vectores de transferencia génica

El primer requisito para el éxito de la terapia génica es la posibilidad de una administración eficiente del material génico, para lo cual se han desarrollado una amplia variedad de vectores de transferencia génica virales y no virales. Cada uno de estos vectores presenta ventajas concretas en función de la capacidad de transporte del ADN, el tipo de células diana, eficiencia de transferencia génica *in vivo*, durabilidad de la expresión y capacidad de inducción de inflamación⁵.

2.3.1.1.- Retrovirus

Su principal ventaja deriva de su capacidad para lograr *in vitro* una transferencia génica eficiente en una amplia variedad de células diana, además de conseguir una expresión prolongada y la integración en el genoma del huésped. Los retrovirus han sido empleados en la transducción de células mesoteliales o tumorales *in vitro* con posterior reinyección de las mismas, sin embargo el éxito de su empleo en la cavidad pleural es limitado debido a los glicosaminoglicanos y proteoglicanos del condroitín sulfato, que inhiben la correcta transferencia génica⁵.

2.3.1.2.- Adenovirus

Los vectores más ampliamente empleados en los ensayos clínicos realizados en humanos son los adenovirus recombinantes: adenovirus con delección de determinadas regiones génicas que han sido reemplazadas con genes terapéuticos controlados por promotores tumorales específicos o generales. Estos vectores ofrecen como principales ventajas la elevada eficiencia en la transducción a las células diana y los elevados niveles de expresión del transgen administrado, así como la inducción de una respuesta inflamatoria local y sistémica. En lo que a los inconvenientes se refiere, debe destacarse la transitoriedad de la expresión génica. Las células mesoteliales sanas y las células tumorales del mesotelioma han sido transducidas por vectores adenovíricos *in vitro* e *in vivo*. En este sentido existen estudios en los que se ha confirmado la transferencia génica intratumoral en el espacio pleural, mediante la detección de ADN y ARN transgénico, así como de determinadas proteínas, a los 3 días de la instilación del vector¹⁵.

2.3.1.3.- Vectores no víricos

Existe una amplia variedad de vectores no víricos, siendo los liposomas los más comúnmente empleados, tanto en los ensayos clínicos humanos como en los modelos animales.

Los liposomas son bicapas lipídicas artificiales diseñadas para translocar drogas o ácidos nucleicos en el citosol celular mediante la fusión a la membrana celular o endocitosis. Los complejos liposoma-ADN son menos eficientes que los vectores víricos y únicamente proporcionan expresión génica transitoria, sin embargo ofrecen simplicidad en su creación, aumento en la capacidad de envoltura del ADN y un alto grado de seguridad.

Hortobagyi y colaboradores¹⁶ desarrollaron un ensayo fase I en el que se administraban semanalmente liposomas que contenían el gen adenovírico E1A (DCC-E1A) en la cavidad pleural o peritoneal. Participaron 18 pacientes con diseminación metastásica de carcinoma mamario o de ovario a nivel de la serosa peritoneal y/o pleural. La expresión del gen E1A en las células tumorales fue detectada mediante técnicas de inmunohistoquímica y por transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), apreciándose infra-regulación del HER-2/neu y apoptosis de las células tumorales. La toxicidad asociada consistió en fiebre, náuseas y molestias en el lugar de inyección.

2.3.2.- Terapia con genes

En la actualidad están siendo investigadas múltiples líneas de terapia génica para diferentes tipos de tumores, en las que se incluye el empleo de genes suicidas, genes supresores de tumores y genes inmunomoduladores⁵.

2.3.2.1- Terapia con genes suicidas

Este tipo de terapia implica la administración de ADN codificador para un enzima capaz de transformar una sustancia (generalmente fármacos) en un metabolito tóxico. El vector más ampliamente estudiado para la vehiculación de genes suicidas son los adenovirus y la enzima empleada con más frecuencia en los ensayos clínicos en humanos y en modelos animales, es la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSVtk), que sensibiliza a las células tumorales frente a los análogos de nucleósidos del ganciclovir y valaciclovir. Su eficacia terapéutica se ve aumentada debido a que no es necesaria la expresión transgénica en todas las células tumorales para la regresión tumoral y a que induce respuestas inmunes antitumorales capaces de destruir células cancerígenas que no expresen HSVtk^{17,18,19,20}.

2.3.2.2.- Terapia con genes supresores de tumores

Una de las primeras aproximaciones a la terapia génica en las neoplasias ha sido la compensación de las mutaciones, es decir, reemplazar los genes supresores de tumores mutados o ausentes responsables del fenotipo maligno de las células tumorales. La administración intratumoral del gen de la variante *salvaje* del p53 (wt-p53), se ha llevado a cabo en diversos ensayos clínicos realizados con enfermos afectados de carcinoma broncogénico y otras variantes de tumores sólidos⁵.

Los vectores adenovíricos transportadores de wt-p53 han sido aprobados en China para su inyección intratumoral en neoplasias de cabeza y cuello y han sido empleados ocasionalmente en el tratamiento del carcinoma broncogénico. Dong y colaboradores²¹ evaluaron la eficacia de la inyección de adenovirus recombinante wt-p53 (rAd-p53) combinada con la administración intrapleurales o intraperitoneal de cisplatino, en el tratamiento del derrame pleural maligno y la ascitis neoplásica. Tras la realización de toracocentesis o paracentesis, los pacientes recibieron rAd-p53 intracavitario una vez a la semana durante 4 semanas consecutivas, asociado a cisplatino intracavitario a las 48 horas de la administración del rAd-p53 (grupo de tratamiento (n=27)). En el grupo control sólo se administró cisplatino (n=21). La respuesta se determinó evaluando la evolución del derrame pleural o la ascitis, mediante la clínica y estudios de imagen -Tomografía computarizada (TC)- y analíticos (marcadores tumorales). La tasa de efectividad global determinada en el grupo de tratamiento resultó de un 63% frente a un 42% en el grupo control.

En un estudio de similares características, Zhao y colaboradores²² evaluaron la eficacia clínica y la toxicidad del rAd-p53 combinado con cisplatino en 35 pacientes que presentaban derrame pleural maligno asociado a carcinoma broncogénico. Los 35 pacientes fueron randomizados para recibir el tratamiento combinado (n=17) o sólo el cisplatino (n=18), administrándose además en ambos grupos tratamiento quimioterápico sistémico con vinorelbina. La tasa total de efectividad en el control del derrame pleural fue de un 82.35% en el grupo de tratamiento combinado y de un 50% en el grupo control ($p < .05$) y la toxicidad registrada resultó escasa.

A pesar de los aparentemente buenos resultados en ambos estudios, debe señalarse la limitación de que no se han evaluado la regresión de la enfermedad ni la supervivencia, por lo que es posible que los resultados obtenidos sean debidos a la inducción de una reacción inflamatoria y la consecuente pleurodesis.

2.3.3.- Terapia con citoquinas

El desarrollo de genes codificadores de citoquinas para el tratamiento de pacientes con neoplasias pleurales genera un gran interés. La expresión génica de citoquinas por las células tumorales originaría un elevado nivel de citoquinas intratumorales induciendo la apoptosis celular en el tumor, inhibiendo la angiogénesis y generando una respuesta inmune antitumoral de tipo celular y humoral. La activación de células dendríticas tumor-infiltrantes que migrarían a ganglios linfáticos regionales, estimularía la producción de linfocitos T CD8 y CD4 específicos de tumor, facilitando así la citotoxicidad antitumoral a distancia. Al mismo tiempo se incrementarían las citoquinas proinflamatorias intratumorales como la IL-2 y la IL-12, venciendo las señales de tolerancia para producir linfocitos T citotóxicos específicos de tumor y activar las células NK.

Los ensayos clínicos realizados hasta el momento en los que se ha administrado a nivel intrapleural interferón recombinante con un adenovirus como vector, han documentado una transferencia génica exitosa, induciendo respuestas inmunes antitumorales de tipo humoral y celular, sin embargo la eficacia de dichas terapias ha sido limitada. Debido a la complejidad en la patogénesis de múltiples neoplasias malignas, el futuro radica en la combinación de terapias que empleen otras citoquinas inmunoestimuladoras o vacunas tumorales²³.

2.4.- Lesión celular asociada a la hipertermia. Hipertemia intracavitaria

La teoría sobre el daño tisular provocado por los efectos de la hipertermia a nivel celular, ha sido la causa de múltiples investigaciones desde hace décadas. En la actualidad, es conocido que la hipertermia aumenta la permeabilidad celular, altera el metabolismo de las células y mejora el transporte de membrana de algunos fármacos.

El primer estudio documentado en relación al efecto de la hipertermia a nivel celular, corresponde a Lambert y se desarrolló en el año 1912. Empleando uno de los primeros sistemas de cultivo celular, evidenció que las células sarcomatosas de rata y ratón eran más termosensibles que las células mesenquimales sanas²⁴.

Vollmar en 1941, llevó a cabo un estudio sobre la supervivencia celular a temperaturas supranormales empleando también células de roedores. Comparó el efecto de la hipertermia en células esplénicas sanas (fibroblastos) y en células neoplásicas (sarcoma de Jensen), determinando que las células neoplásicas podían ser eliminadas con temperaturas de entre 40 °C y 42 °C, mientras que las células sanas resistían la exposición a temperaturas superiores a 43 °C²⁴.

En 1966 Bender y Schramm publicitaron los resultados del efecto de la hipertermia sobre células procedentes de cultivos celulares de 46 tipos diferentes de tumores animales y humanos. Las células fueron sometidas durante 30 minutos a diferentes temperaturas empleándose como grupo control células de cultivos embrionarios de diferentes órganos de 6 especies diferentes. Se pudo observar que las células tumorales eran 1°C a 2°C más termosensibles que las células sanas, no obstante no se estimó de forma cuantitativa el efecto de la hipertermia. También en 1966, Auersperg publicó un estudio realizado con fibroblastos humanos sanos y células epiteliales derivadas de líneas carcinomatosas, determinando que las células neoplásicas presentaban mayor supervivencia que los fibroblastos tras ser sometidas a temperaturas elevadas. Sin embargo todas las determinaciones de viabilidad celular se realizaron con métodos indirectos de tinción que posteriormente demostraron no ser fiables para dichas determinaciones²⁴.

Chen y Heidelberger en 1969 objetivaron mayor termosensibilidad en células prostáticas de ratón tras su transformación maligna mediante un tratamiento con hidrocarburos aromáticos policíclicos. Dichas células presentaban capacidad de inducir tumores al ser inoculadas en ratones singénicos, demostrando que cuando las células adquirían características de malignidad se hacían más termosensibles de lo que eran en su origen²⁴.

En 1976 Giovanella y colaboradores publicaron los resultados de un estudio en el que se comparaba el efecto letal selectivo *in vitro* de la hipertermia en células neoplásicas, en relación a células sanas del mismo tipo histológico. Las células tumorales se obtuvieron de piezas quirúrgicas de intervenciones realizadas en humanos y se procesaron en laboratorio para su cultivo *in vitro* como líneas celulares con capacidad indefinida de reproducción. Dichas células se inocularon en ratones timo-deficientes y el trabajo experimental se llevó a cabo con el tejido obtenido de los tumores desarrollados en los roedores. Las células sanas fueron obtenidas de tejidos fetales de embriones humanos de entre 6 y 12 semanas procedentes de abortos terapéuticos. Los cultivos celulares fueron sometidos a temperaturas de 42.5°C a 43°C y se extrajeron células a las 2, 4 y 8 horas, volviéndose a incubar posteriormente a 37°C. A pesar de la amplia fluctuación en cuanto a la sensibilidad entre los diferentes tipos histológicos, en todos los casos las células neoplásicas se vieron afectadas más severamente por la hipertermia que las células sanas²⁴.

Alentados por estos resultados y basándose en la teoría de que la hipertermia podría inducir apoptosis en las células neoplásicas, en los años 80 se inician los primeros estudios de infusión de soluciones hipertérmicas con intención terapéutica a nivel peritoneal en modelos animales. Aproximadamente una década más tarde, se comienza la experimentación de la hipertermia a nivel intrapleural²⁵.

2.5.- Quimioterapia intrapleural

Las enfermedades malignas que afectan a la pleura presentan en la mayor parte de los casos un pronóstico sombrío a corto plazo. Las neoplasias primitivas de la pleura se caracterizan por presentar agresividad y progresión principalmente a nivel locorregional y, a pesar de que la exéresis quirúrgica completa puede ser posible en algunas circunstancias, la probabilidad de que exista enfermedad residual microscópica es muy elevada. En los casos de afectación pleural metastásica, el abordaje quirúrgico estaría, en principio, contraindicado.

Dichas particularidades han hecho necesario el desarrollo de nuevas terapias que permitan un mejor control de la enfermedad a nivel local, siendo en la actualidad una de las más relevantes la administración de fármacos con efecto citostático en el espacio pleural. Por otra parte, la cavidad pleural ofrece una fácil accesibilidad para la aplicación de este tipo de tratamientos y la evaluación de su efectividad⁵.

El empleo de la quimioterapia a nivel intracavitario en el espacio pleural, surge de la hipótesis de que la administración de citostáticos a nivel local tendría un mayor efecto antitumoral, debido al contacto directo del fármaco con las células tumorales y a la posibilidad de administrar una mayor dosis de fármaco con menores (o casi inexistentes) efectos adversos a nivel sistémico²⁶.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que han tratado de determinar la efectividad de la administración intrapleural de citostáticos a pacientes afectos de neoplasias pleurales de diversa estirpe. En todos ellos han sido empleados diferentes fármacos a diversas concentraciones y siguiendo múltiples esquemas terapéuticos, siendo los resultados disponibles hasta la fecha, discordantes y contradictorios. Algunos de estos estudios han obtenido beneficios en la supervivencia mientras que en otros no se han detectado diferencias en este sentido. Por otra parte en la mayor parte de los mismos el número de pacientes es escaso y carecen de randomización, por lo que los datos obtenidos deben ser considerados con cautela.

Todo ello hace que en la actualidad la efectividad de la quimioterapia intrapleural no esté del todo aclarada y no se disponga de la evidencia científica necesaria para su administración protocolizada²⁶.

Un supuesto sobre el que se ha teorizado ampliamente, es el de que la asociación de hipertermia a la quimioterapia intrapleural podría aumentar su eficacia, dado que los efectos del incremento térmico harían a las células más vulnerables al efecto de los citotóxicos. Ya en los años 80 se publicitaron trabajos en modelos animales que evidenciaban que la hipertermia potenciaba el efecto citotóxico de algunos quimioterápicos²⁷.

Sobre la base de estas teorías y los resultados de múltiples estudios, se inicia de forma progresiva el desarrollo de la terapia local en las enfermedades neoplásicas de las serosas, mediante la aplicación de quimioterapia o de hipertermia aisladas, así como de quimioterapia hipertérmica a nivel intracavitario.

A modo de resumen podemos decir que las terapias inmunomoduladoras podrían resultar beneficiosas en fases iniciales de la enfermedad y parecen aportar mejores efectos en cuanto a pleurodesis y control del derrame pleural que los tratamientos empleados hasta el momento. La terapia génica puede convertirse en un tratamiento prometedor, pero aún son necesarios múltiples estudios randomizados y que incluyan un amplio número de pacientes para poder plantear su empleo en la clínica. La quimioterapia intrapleural aislada ofrece, en principio, un escaso beneficio en el tratamiento de las neoplasias pleurales. Sin embargo, si tenemos en cuenta los resultados de múltiples publicaciones, la aplicación de quimioterapia hipertérmica, asociada o no a cirugía cito-reductora, parece mostrar una gran eficacia como alternativa terapéutica en el manejo de la afectación neoplásica de la pleura⁵.

3.- Efecto de la hipertermia, de los citostáticos y de la quimioterapia hipertérmica a nivel local. Resultados de la quimioterapia hipertérmica intrapleural

La evolución y el interés en este nuevo tipo de tratamientos se han ido incrementando paulatinamente. En los últimos años han sido muchos los grupos de investigación que han llevado a cabo diversos estudios con el fin de determinar la eficacia y seguridad de la aplicación de quimioterapia hipertérmica a nivel intrapleural.

Para poder establecer cuál es el estado actual, en lo que a la investigación y aplicación de la quimioterapia hipertérmica intrapleural se refiere, a continuación referiremos la metodología y los resultados de los estudios más relevantes que han sido publicados en este sentido. La mayor parte de los trabajos citados corresponden a publicaciones de los últimos años, debido a que el periodo de mayor actividad investigadora y producción científica en este campo comenzó a principios de los años 2000.

En 1994 se publica en *Chest* el trabajo de Figlin²⁸ relativo al ensayo 861 del lung cancer study group (LCSG), que parte de la teoría de que la administración intrapleural de agentes quimioterápicos tendría un efecto potencialmente ventajoso en el tratamiento del derrame pleural maligno respecto a los agentes esclerosantes. El estudio se basa en el hecho de que la administración de quimioterapia intrapleural no sólo lograría un mejor control del derrame, sino que además controlaría la enfermedad subyacente. En el ensayo participaron 46 pacientes sintomáticos afectados de derrame pleural maligno en relación con diferentes neoplasias, con demostración citológica de malignidad en todos los casos y ausencia de aplicación de tratamientos previos para el control del derrame. Una única dosis de cisplatino (100 mg/m²) y citarabina (1,200 mg) fue administrada a nivel intrapleural a través de un drenaje torácico que se retiró inmediatamente después de la instilación. La tasa de respuesta global al tratamiento fue del 49% y la mediana de tiempo en que se mantuvo la respuesta fue de 9 meses en los casos de respuesta completa y de 5,1 meses para la respuesta parcial. La toxicidad registrada fue muy escasa y de grado leve en todos los casos. El estudio concluye que la administración de citostáticos en el régimen ensayado no se muestra superior a la pleurodesis con agentes esclerosantes.

En 1999 Thoda y colaboradores²⁹ realizan un estudio en 70 pacientes afectados de derrame pleural maligno asociado a carcinoma pulmonar no microcítico. Tras la evacuación del derrame se administró una dosis simultánea de cisplatino (80 mg/m²) y etopósido (80 mg/m²) en la cavidad pleural que se mantuvo durante 72 horas. La tasa global de respuesta fue de un 46,2%, la mediana de supervivencia de 32.2 semanas, la tasa de supervivencia a un año del 28,7% y la tasa de supervivencia a los dos años del 12,8%. Las reacciones adversas observadas fueron anemia, vómitos, toxicidad pulmonar leve, fiebre e infección. Dichos resultados apoyaban la administración intrapleural conjunta de cisplatino y etopósido como una opción efectiva en el tratamiento de estos pacientes.

Shoji y colaboradores³⁰ publican en el año 2002 los resultados de un estudio prospectivo en el que se incluyen 22 pacientes con derrame pleural maligno demostrado histológicamente (17 casos secundario a carcinoma pulmonar, 3 casos secundario a mesotelioma y 2 casos secundario a carcinoma mamario). Se administró 5 fluorouracilo (5-FU) a dosis de 250 mg y cisplatino (10 mg) 2 veces por semana de forma repetida, a través de un catéter permanente con tunelización subcutánea y reservorio. De manera concomitante se administró por vía oral UFT, un agente anticanceroso desarrollado y aprobado para el uso clínico en Japón, derivado del 5 fluorouracilo. La media de la dosis total administrada de 5-FU y cisplatino fue de 3,290 mg y 124 mg respectivamente y la tasa media de administraciones de 17,3 +/- 11,6. El periodo medio de seguimiento fue de 431 días (209-792) con una mediana de supervivencia global de 402 días. En 2 de los 3 casos de mesotelioma y en todos los casos de carcinoma mamario, no se calculó la mediana de supervivencia por permanecer vivos los pacientes al finalizar el tiempo de seguimiento. No se registró mortalidad asociada al tratamiento ni tampoco casos de toxicidad renal, infecciosa o hematológica. El estudio concluye que la administración repetida de citostáticos intrapleurales es un procedimiento seguro y eficaz en el tratamiento de los derrames pleurales malignos, aunque considera necesaria la realización de estudios randomizados con un mayor número de pacientes para poder establecer de forma definitiva la efectividad de dicha terapia.

En 2004 Chang y Sugarbaker³¹, autores pioneros en esta línea de investigación, publican los resultados de la aplicación de quimioterapia hipertérmica intraoperatoria tras resección quirúrgica de mesotelioma pleural maligno. El objetivo del estudio fue ensayar el efecto sinérgico y de potenciación de la hipertermia y los citostáticos a nivel intrapleural, estableciéndose dos grupos de pacientes en función del tipo de exéresis quirúrgica realizada: neumonectomía extrapleural (n=50) o pleurectomía/decorticación (n=44). Tras finalizar la cirugía se realizó lavado de la cavidad pleural mediante dos drenajes torácicos de grueso calibre (de entrada y salida) conectados a un sistema de circulación extracorpórea. El volumen de lavado empleado se ajustó en cada paciente para mantener la cavidad pleural rellena por completo, aumentando así la superficie de tratamiento. La dosis de cisplatino administrada fue de 250 mg/m² en el grupo de la neumonectomía y de 225 mg/m² en el grupo de la decorticación. La infusión se realizó a 42°C durante 60 minutos. Posteriormente fue administrada una solución de tiosulfato sódico (agente que ha demostrado neutralizar el cisplatino), con el fin de reducir la toxicidad asociada.

En ambos casos los resultados de morbimortalidad y toxicidad se compararon con los de un grupo control, en el que se practicó una neumonectomía extrapleural sin aplicación posterior de quimioterapia hipertérmica. La mortalidad resultó discretamente superior en el grupo de la decorticación, posiblemente en relación con un peor status general y cardiopulmonar de los pacientes de este grupo (condicionantes de la realización de una cirugía menos agresiva). La morbilidad resultó mayor de forma significativa en el grupo de la neumonectomía. No se apreciaron diferencias significativas en cuanto a toxicidad renal o hematológica. Los autores concluyen que este tipo de terapia es segura, por lo que podría valorarse su aplicación en la clínica. No obstante, consideran necesarios estudios prospectivos randomizados para poder establecer su efectividad en términos de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.

También en 2004, Matsuzaki³² publica uno de los pocos estudios que existen al respecto en el que se determina el efecto a nivel celular de la quimioterapia hipertérmica. Basándose en los datos sobre inducción de apoptosis en células tumorales y la potenciación del efecto citotóxico de algunos quimioterápicos por la hipertermia, el trabajo se propone determinar el porcentaje de apoptosis celular en células de líquidos pleurales neoplásicos, antes y después de la administración de quimioterapia hipertérmica intrapleural. Además se compara la supervivencia de los pacientes sometidos al tratamiento intrapleural con la de un grupo control. 11 pacientes que presentaban adenocarcinoma pulmonar con afectación pleural (sin afectación extratorácica), fueron sometidos a cirugía de exéresis de la lesión pulmonar y posterior perfusión intrapleural del citostático (cisplatino). La perfusión se realizó irrigando la cavidad pleural durante 2 horas con tres litros de una solución salina al 43% que contenía 200 mg/m² de cisplatino. Resulta llamativo que en la publicación no se especifica la temperatura a la que se realizó la irrigación, únicamente se describe que se aplica el tratamiento *“incrementando la temperatura”* y se utiliza así mismo el término hipertermia, pero sin citar la temperatura exacta de infusión del fármaco. Todos los pacientes recibieron además tratamiento complementario adyuvante con quimioterapia sistémica. Se recogieron células del líquido pleural antes de la perfusión y 24 horas después del tratamiento, determinándose el porcentaje de apoptosis celular mediante tinción inmunohistoquímica.

Para el estudio de supervivencia se comparó a los pacientes sometidos a quimioterapia hipertérmica con otro grupo de 11 pacientes de similares características sometidos a cirugía y quimioterapia sistémica complementaria, sin perfusión de quimioterapia hipertérmica intrapleural. El índice de apoptosis celular en el líquido pleural antes de la infusión de cisplatino hipertérmico resultó de un 2,8% +/- 2.0%, y del 25,2% +/- 4,6% a las 24 horas del tratamiento (estadísticamente significativo). El tiempo medio de supervivencia en los pacientes sometidos al tratamiento intrapleural fue de 20 meses, mientras que en el grupo control fue de 6 meses. Matsuzaki concluye que la quimioterapia hipertérmica a nivel local induce apoptosis celular y proporciona un mayor control de la enfermedad aumentando la supervivencia de los pacientes, si bien el escaso tamaño muestral hace tomar con reserva los resultados.

En 2006 Seto y colaboradores³³ publican los resultados de un ensayo clínico fase II que tenía el objetivo de determinar la efectividad del tratamiento intrapleural con cisplatino hipotónico en el control del derrame pleural maligno. Los criterios de elegibilidad de los pacientes fueron: presentar derrame pleural maligno citológicamente probado secundario a carcinoma pulmonar de células no pequeñas que no se hubiera tratado previamente, ser menor de 80 años, no presentar alteraciones analíticas importantes referidas a la función renal y/o hepática, posibilidad de expansión pulmonar efectiva tras el tratamiento y un *performance status*, según criterios del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), de 0 a 2. Tras evacuación del derrame, se instiló un volumen de 500 mililitros de agua destilada con una concentración de cisplatino de 25 mg, que se mantuvo en la cavidad pleural durante una hora. En ningún caso se administró quimioterapia sistémica ni radioterapia local en las 4 semanas siguientes al tratamiento intracavitario. La toxicidad fue evaluada en base a los criterios de la ECOG y la respuesta al tratamiento se determinó basándose en radiografías simples de tórax en proyección posteroanterior y lateral realizadas a las 4 semanas de la administración del fármaco. Se consideró respuesta completa la ausencia de derrame pleural, respuesta parcial la presencia de derrame en una cantidad inferior al 25% del eje mayor del hemitórax y ausencia de repuesta la presencia de derrame pleural de mayor cuantía. En los pacientes con respuesta parcial o completa se realizó una radiografía de tórax al menos una vez al mes durante el periodo de seguimiento. El grado de respuesta y la duración de la misma fueron determinados por un comité externo de revisores.

El tiempo libre de progresión del derrame fue definido como el tiempo comprendido entre la administración del tratamiento y la aparición de derrame pleural superior al 25% del eje mayor del hemitórax o fallecimiento del paciente. La supervivencia global se estableció como el tiempo desde la inclusión en el estudio y el fallecimiento del enfermo por cualquier causa. El primer objetivo del estudio era determinar la tasa de respuesta global, ya que en caso de ser superior al 75% se proseguiría con la investigación, mientras que un resultado por debajo del 60% conllevaría la suspensión del estudio. 80 pacientes con una edad media de 67 años e histología correspondiente a adenocarcinoma pulmonar, en la mayor parte de los casos, participaron en el estudio. No se registró toxicidad relevante. La tasa global de respuesta fue del 83% (34% respuesta completa y 49% respuesta parcial). La mediana de tiempo de respuesta fue de 206 días (36 – 949), la mediana de seguimiento fue de 1045 días, con una media de supervivencia libre de progresión de 173 días y una tasa a un año libre de progresión de un 31,8%. La mediana de supervivencia resultó de 239 días y la tasa de supervivencia a un año del 39%. Los autores concluyen que la administración de cisplatino hipotónico parece presentar mejores resultados que otros tipos de tratamiento empleados de forma generalizada, debido probablemente a los siguientes factores: 1.- el agua destilada por sí misma tiene citotoxicidad directa, 2.- las células tumorales expuestas a cisplatino hipotónico aumentan sus niveles de cisplatino debido a la hinchazón secundaria a la solución hipotónica, 3.- la hidrólisis del cisplatino con el agua destilada origina la formación de agentes antitumorales activos. Sin embargo, a pesar de los resultados satisfactorios, los autores consideran que son necesarios más estudios para poder plantear el tratamiento con cisplatino hipotónico intrapleural como una alternativa terapéutica.

De nuevo Matsuzaki³⁴ publica en 2008 un estudio realizado en pacientes afectados de mesotelioma pleural maligno, cuyo objetivo es analizar la inducción de apoptosis celular mediante quimioterapia hipertérmica intrapleural. Dado que se trata de un estudio con un escaso número muestral (n=6), no se realizan estudios de supervivencia. Los pacientes incluidos presentaban estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) por lo que ninguno había sido sometido a tratamiento quirúrgico de exéresis.

La infusión intrapleural se llevó a cabo bajo anestesia general, mediante la realización de toracoscopia y colocación de dos drenajes pleurales conectados a un circuito especialmente ideado para el procedimiento. Durante dos horas se administraron 3000 mililitros de solución salina a 43°C con cisplatino en una dosis de 200 mg/m². Para determinar la apoptosis inducida por el tratamiento, se recogieron células presentes en el fluido pleural antes de iniciar la infusión y a las 24 y 48 horas de la realización del procedimiento. Se registraron cifras de apoptosis espontánea (determinación basal) de un 3,8% +/- 2,0%. El porcentaje de apoptosis en las células recogidas a las 24 y 48 hs del tratamiento, resultó del 63,8% +/- 8,2% y 47,8% +/- 6,9 % respectivamente, determinándose un incremento claramente significativo, con un pico a las 24 horas. El autor concluye la existencia de un efecto sinérgico de la hipertermia y el cisplatino, capaz de inducir apoptosis en las células tumorales. Por otra parte, ya que en un estudio previo del mismo autor (citado previamente) realizado en pacientes con afectación pleural por adenocarcinoma pulmonar el índice de apoptosis registrado resultó inferior (de un 25,2 %), parece que el mesotelioma sería más sensible que el adenocarcinoma al tratamiento con quimioterapia hipertérmica. Finalmente, se apunta la necesidad de realizar estudios con un mayor número de pacientes y afectación por neoplasias de diferentes tipos histológicos, para poder determinar la inclusión de esta terapia en el esquema de tratamiento multimodal empleado en enfermos con afectación pleural neoplásica.

A principios de 2010 Jones y colaboradores³⁵ publican los resultados de un ensayo clínico fase I diseñado para determinar la seguridad, viabilidad y farmacocinética de la administración de una dosis única de docetaxel intrapleural en el tratamiento del derrame pleural maligno. Para ser incluidos en el ensayo los pacientes debían presentar derrame pleural maligno sintomático y confirmado histológica o citológicamente, no presentar contraindicaciones para la realización de toracoscopia y tener un performance status de 2 o menos en la escala ECOG. Se consideraron criterios de exclusión la realización de pleurodesis previa, presencia de derrame pleural bilateral e hipersensibilidad al docetaxel.

Dado que el principal objetivo del ensayo era determinar la dosis máxima tolerada de docetaxel intrapleural, los pacientes fueron asignados a una de las cuatro cohortes establecidas en función de la dosis administrada: 50 mg/m², 75 mg/m², 100 mg/m² o 125 mg/m², correspondiendo la dosis más baja (50 mg/m²) a 0.66 veces la dosis intravenosa recomendada para el tratamiento sistémico. En el caso de que dos o más pacientes presentasen toxicidad importante (toxicidad limitante de dosis), serían asignados a la cohorte inferior y dicha dosis sería determinada como la dosis máxima tolerada. En el ensayo participaron 15 pacientes que presentaban derrame pleural maligno secundario a carcinoma broncogénico no microcítico (n=8), carcinoma mamario (n=4), carcinoma ovárico (n=1), carcinoma de cabeza y cuello (n=1) y mesotelioma pleural maligno (n=1). Todos los pacientes habían recibido previamente quimioterapia sistémica o radioterapia y el 80% recibieron nuevamente tratamiento oncológico adyuvante tras la administración de la quimioterapia intrapleural. Se realizó una toracoscopia bajo anestesia general con evacuación del derrame y colocación de dos drenajes pleurales. Cuando el débito resultó inferior a 300 ml/día, no se evidenció fuga aérea y la radiografía de tórax demostró ausencia de neumotórax y/o derrame pleural, se procedió a la instilación de 100 mililitros de suero salino, con la dosis correspondiente de docetaxel, a través de uno de los drenajes y se mantuvo durante 4 horas en la cavidad pleural. Se tomaron muestras de sangre periférica y líquido pleural en el momento de la intervención (determinación basal) y a los 30 y 60 minutos y 6, 24 y 36 horas tras la administración del fármaco. El grado de respuesta fue determinado en base a criterios radiológicos, considerándose respuesta completa la desaparición del derrame y respuesta parcial la reducción del mismo en al menos un 75%. Una reducción inferior al 75% o un aumento no superior al 25% se consideró como estabilización y el aumento por encima del 25% progresión. La aparición de efectos adversos presentó una distribución heterogénea y no relacionada con la dosis administrada. Se registró elevación de transaminasas, dolor pleurítico, fiebre, infección local y, en un escaso porcentaje de casos, taquicardia, embolismo pulmonar, neumotórax e hiponatremia.

El 90% de los pacientes que recibieron una dosis de 75 mg/m² o mayor presentaron respuesta completa. 6 pacientes desarrollaron recurrencia del derrame y todos fallecieron durante el período de seguimiento, con una mediana global de supervivencia de 3.6 meses. La mediana de supervivencia por grupos fue de 4, 2.7, 8.5 y 3.1 meses respectivamente para las dosis de 50mg/m², 75mg/m², 100mg/m² y 125 mg/m². En cuanto a la farmacocinética, el pico de concentración intrapleural se alcanzó a los 60 minutos de la administración del fármaco y los picos de concentración plasmática aparecieron a las 0,5 y 6 horas posteriores a la administración intrapleural. El estudio concluye que la administración de docetaxel intrapleural a las dosis descritas es segura, aunque resultan necesarios estudios con un mayor número de pacientes para poder asegurar la efectividad del tratamiento.

También en el año 2010, Kimura³⁶ publica los resultados de un estudio en el que se compara el efecto de la hipertermia aislada y la quimioterapia hipertérmica en pacientes con afectación pleural secundaria a carcinoma broncogénico. Teniendo en cuenta el mal pronóstico y la sintomatología que habitualmente acompaña y condiciona la calidad de vida de estos enfermos, el estudio trata de determinar si la terapia intrapleural podría ser efectiva en la prevención de la recidiva del derrame y al mismo tiempo aportar una mejoría en el pronóstico. Los 19 participantes fueron pacientes diagnosticados de carcinoma pulmonar no microcítico, objetivándose la diseminación pleural (presencia de derrame neoplásico) en el momento de la cirugía de exéresis pulmonar. 7 de los pacientes recibieron hipertermia intraoperatoria (grupo A), 5 quimioterapia hipertérmica (grupo B) y los otros 7 no recibieron ningún tratamiento intrapleural complementario (grupo C). Resulta llamativo que en la publicación no se especifican los criterios seguidos para la asignación de los pacientes a los distintos grupos. La edad media de los pacientes del grupo A resultó significativamente mayor que la de los del grupo C, no existiendo diferencias significativas en cuanto al estadio preoperatorio en el que se clasificaron los pacientes: estadio I 8 pacientes, estadio II 5 pacientes y estadio IIIA 6 pacientes. Todos los participantes fueron sometidos a exéresis quirúrgica de la lesión pulmonar primaria mediante cirugía videoasistida y una vez finalizada la intervención se procedió a la irrigación intrapleural.

En los pacientes del grupo A se administró una solución salina al 0,9% a una temperatura de 43°C durante 30 minutos. En los pacientes del grupo B se administró una solución salina al 0,45% con 100 mg de cisplatino, en las mismas condiciones de temperatura y tiempo que en el grupo A. Todos los pacientes recibieron tratamiento quimioterápico sistémico complementario tras la cirugía. Se realizó lobectomía en 10 participantes, exéresis sublobar en 6 y toracotomía exploradora en 3. La mediana de supervivencia fue de 19,4 meses en el grupo A, de 41 meses en el grupo B y de 25 meses en el grupo C, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas en lo referente a la tasa de supervivencia global entre los grupos. No se detectó recidiva durante el periodo de seguimiento en ningún paciente del grupo A, únicamente en un caso en el grupo B y en 3 casos en el grupo C. Dicha diferencia resultó estadísticamente significativa entre los grupos A y C, pero no así entre los grupos A y B. El estudio considera que la terapia hipertérmica intrapleurar, asociada o no a citostáticos, es un procedimiento efectivo en el control del derrame pleural aunque sin que se evidencien claros beneficios en la supervivencia.

Chen y colaboradores³⁷ publican en el año 2012 el estudio con mayor número muestral de los que se dispone en este sentido. Se trata de un estudio prospectivo y randomizado, con el que los autores tratan de evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento intrapleurar combinado con cisplatino y OK-432 (picibanil) asociados a hipertermia. Un total de 358 pacientes con derrame pleural secundario a diversas neoplasias primarias fueron asignados aleatoriamente a dos grupos, en función del tratamiento a recibir: cisplatino y OK-432 asociados a hipertermia (grupo A, n=179) o cisplatino y OK-432 sin hipertermia (grupo B, n=179). La toxicidad detectada (náuseas, vómitos, depresión mieloide y pirexia) resultó similar en ambos grupos. Los pacientes del grupo A mostraron una respuesta global significativamente más elevada que los del grupo B, con porcentajes del 93,4% y 79,8% respectivamente. La mediana de supervivencia resultó de 8,9 y 6,2 meses para los grupos A y B respectivamente, no alcanzándose la significación estadística. Con los resultados obtenidos, los autores concluyen que la combinación de fármacos asociada a hipertermia resulta efectiva en el control del derrame pleural maligno sin que pueda, por el momento, demostrarse un beneficio en la supervivencia.

También en el año 2012, Lombardi³⁸ publica un estudio fase II en el que se administró paclitaxel intrapleurales a mujeres con afectación pleural maligna secundaria a carcinoma de mama y ovario. Los criterios de inclusión en el estudio fueron presentar un derrame recidivante, sintomático e histológicamente probado, expansión pulmonar probada tras la evacuación del derrame, ECOG de 0 a 2 y supervivencia estimada superior a un mes. Se consideraron criterios de exclusión enfermedad cardiológica, afectación bilateral del derrame y presencia de metástasis cerebrales. Así mismo, era preciso no haber recibido previamente tratamientos intrapleurales (esclerosantes o de otro tipo) ni oncológicos (radio, quimio u hormonoterapia) en las 4 semanas previas a la inclusión en el estudio. De las 18 pacientes participantes, 11 presentaban carcinoma de ovario y 7 carcinoma mamario. En todos los casos habían recibido tratamiento sistémico con quimioterapia previamente. Se colocó un drenaje pleural de fino calibre (8 F) a todas las enfermas y cuando se comprobó radiológicamente la evacuación del derrame y la adecuada expansión pulmonar, se procedió a la administración intrapleurales de 120mg/m² de paclitaxel diluido en 200 mililitros de suero salino, manteniéndose el citostático durante 24 horas en la cavidad pleural. En los casos en los que a las 72 horas de la infusión persistía un débito pleural superior a 200 mililitros/día, se repitió la administración de paclitaxel con el mismo protocolo. Se realizaron radiografías de tórax al mes y a los dos meses del procedimiento y si en la primera evaluación se comprobaba respuesta, la paciente podría recibir quimioterapia sistémica a criterio del evaluador. Se analizaron las concentraciones de paclitaxel en sangre y líquido pleural a la hora y a las 4 y 24 horas de la administración. La ausencia de derrame pleural y de síntomas se consideró respuesta completa. La respuesta parcial correspondió a la presencia de derrame pleural en una cuantía inferior al 50% del volumen inicial y ausencia de síntomas que justificaran la colocación de un drenaje pleural. En los casos en los que la recidiva del derrame supusiera un volumen superior al 50% del inicial y se acompañase de síntomas que aconsejasen la colocación de un drenaje, se determinó progresión de la enfermedad y fallo del tratamiento.

El principal objetivo del estudio era determinar la tasa de respuesta global al tratamiento y como objetivos secundarios se fijaron la determinación del tiempo de progresión (calculado como el tiempo desde la administración del tratamiento hasta la progresión de la enfermedad o fallecimiento) y la seguridad y supervivencia global (calculada como el tiempo desde la administración del tratamiento hasta el fallecimiento o hasta el último día de seguimiento). En todas las pacientes la respuesta se evaluó al mes y a los dos meses. El 83,3% de las pacientes recibieron tratamiento sistémico una vez completadas las primeras 4 semanas tras la administración de paclitaxel intrapleural. En el momento del análisis de los resultados las 18 pacientes integrantes del estudio habían fallecido. En lo que a la toxicidad se refiere, no se detectaron efectos adversos graves y el 22% de las pacientes no presentó ningún tipo de toxicidad. El dolor torácico (67%) y la fiebre (56%) resultaron las complicaciones más frecuentes. La tasa global de respuesta a un mes fue del 77,8% (respuesta completa en un 22,2% y parcial en un 55,6%) y a los dos meses del 88,8% (respuesta completa en un 44,4% y parcial en un 44,4%). El tiempo medio de progresión resultó de 5,5 meses y la mediana de supervivencia de 8,9 meses. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes afectas de carcinoma de ovario respecto a las pacientes con carcinoma de mama. Se evaluó la asociación entre el tipo de respuesta a los dos meses y la supervivencia, encontrándose que las pacientes con respuesta completa a los dos meses del tratamiento presentaban una mayor supervivencia respecto a las que presentaban respuesta parcial o progresión de la enfermedad (con significación estadística). La concentración de paclitaxel intrapleural una hora después de su administración presentó cifras de entre 100 mg/l y 670 mg/l (mediana 545 mg/l), con una media de reducción de niveles a las 24 horas de entorno al 30%. La vida media del fármaco en la cavidad pleural fue de 68,4 horas. Las concentraciones plasmáticas de paclitaxel fueron extremadamente bajas. Tras analizar sus resultados, Lombardi concluye que estas terapias deberían ser incluidas en el protocolo de tratamiento de este de tipo enfermos, junto con el resto de procedimientos habituales ya establecidos, dado que aportan un buen control del derrame pleural y los síntomas asociados, mejorando así la calidad de vida.

Yu y colaboradores³⁹, publican en 2013 los resultados de un estudio realizado en pacientes afectos de timoma o carcinoma tímico locorregionalmente avanzado. Partiendo de los buenos resultados ofrecidos por la quimioterapia hipertérmica a nivel intraperitoneal, así como de los resultados disponibles de los estudios publicados a nivel intrapleural, se plantean determinar la eficacia de dicha terapia en el caso de las neoplasias tímicas. En los casos en que existe afectación locorregional avanzada, el tratamiento habitual de los timomas es la cirugía de exéresis y la radioterapia complementaria posterior, aunque dicho esquema se muestra poco efectivo en el control de la enfermedad. El estudio cuenta con un tamaño muestral muy pequeño (n=4), siendo los participantes pacientes con timoma avanzado que presentaban afectación pleural en todos los casos y pericárdica en uno. Tras quedar descartadas la afectación linfática y/o extratorácica, se procedió a la exéresis videoasistida de la tumoración. Posteriormente se realizó la infusión en el espacio pleural de 4500 a 5000 mililitros de suero salino al 0,9% con 100 mg/m² de cisplatino a una temperatura de 43°C a 44°C durante 2 horas. Los pacientes recibieron radioterapia adyuvante un mes después del tratamiento. El tiempo de seguimiento osciló entre uno y cuatro años. Un paciente presentó neumonía postoperatoria sin que se registrasen casos de toxicidad hematológica ni renal. Otro paciente falleció un año después del tratamiento por causas cardiológicas y en el resto de participantes no se detectaron recurrencia local ni extensión a distancia durante el periodo de seguimiento. El estudio concluye que la quimioterapia hipertérmica intrapleural tras cirugía cito-reductora, puede aportar importantes beneficios en el tratamiento de las neoplasias tímicas localmente avanzadas.

También en 2013 Ried y colaboradores⁴⁰ publican un estudio realizado en 16 pacientes que presentaban timoma en estadio IVa según la clasificación de Masaoka (n=8) y mesotelioma pleural maligno (n=8). Todos los pacientes recibieron terapia trimodal con quimioterapia, radioterapia y cirugía (timectomía o pleurectomía). Tras la exéresis quirúrgica se procedió a la administración de quimioterapia hipertérmica intrapleural mediante la infusión de 2 a 4 litros de solución salina que contenía de 100 a 150 mg/m² de cisplatino, a una temperatura de 42°C durante una hora.

No se registró mortalidad postoperatoria a los 30 días ni complicaciones relevantes en relación al tratamiento intrapleural. Tras un seguimiento medio de 22 meses, 7 de los pacientes afectos de timoma persistían vivos y libres de enfermedad, presentando el restante recaída local a los 6 meses. En 6 de los 8 pacientes con mesotelioma se registró progresión de la enfermedad, presentando una supervivencia del 50% al finalizar el estudio (mediana de supervivencia 18 meses). En los otros dos casos no se detectó recidiva al finalizar el seguimiento. A pesar de contar con un escaso número de pacientes, los autores consideran los resultados satisfactorios y aconsejan valorar el empleo de este tipo de terapia dentro del esquema de tratamiento multimodal de estos pacientes.

Nuevamente en 2013, Du y colaboradores⁴¹ publican los resultados de un estudio en el que se ensaya la administración intrapleural de un anticuerpo monoclonal (bevacizumab) en combinación con un citostático (cisplatino) sin hipertermia asociada. Se incluyeron 70 pacientes con derrame pleural en el contexto de un carcinoma broncogénico no microcítico avanzado, que fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos. El grupo A recibió bevacizumab (300 mg) y cisplatino (30 mg) y el grupo B únicamente el citostático. No se especifica el tiempo de administración, ni el volumen total administrado. Se refiere únicamente que la administración intrapleural de los fármacos se repitió cada 2 semanas, sin señalar tampoco el número total de ciclos. Los pacientes recibieron además quimioterapia sistémica con paclitaxel y carboplatino. El procedimiento fue bien tolerado sin que se registrasen efectos secundarios relevantes. La eficacia de la combinación de drogas resultó estadísticamente significativa, con una tasa de respuesta en el grupo de tratamiento combinado del 83,3% frente al 50% en el grupo que sólo recibió cisplatino. Así mismo se determinaron los valores de VEGF en líquido pleural, apreciándose niveles significativamente más bajos en el grupo A. Tras el análisis de los resultados, los autores consideran que la administración de este tipo de tratamiento a nivel intrapleural resulta segura.

Uno de los escasos estudios disponibles en los que es evaluado el efecto *in vitro* a nivel celular de la quimioterapia hipertérmica, y al mismo tiempo uno de los más relevantes en esta línea de investigación, es el publicado en febrero de 2013 por Cameron y Hou⁴². Diversas líneas celulares fueron seleccionadas y se evaluó la respuesta de las mismas, en lo que a viabilidad celular se refiere, tras someterlas al efecto de la hipertermia y de diversos citostáticos: cisplatino, gemcitabina y pemetrexed. Las células correspondieron a células hipertermo-sensibles de ovario de hámster, fibroblastos sanos de pulmón humano, tres líneas diferentes de mesotelioma pleural maligno humano y una línea celular de carcinoma broncogénico humano. Las temperaturas aplicadas, durante un tiempo de 60 minutos, fueron de 37°C, 42°C y 45°C y se ensayó el efecto del cisplatino de forma aislada y de combinaciones de cisplatino-gemcitabina y cisplatino-pemetrexed. Todas las líneas celulares mostraron un descenso en su porcentaje de viabilidad temperatura-dependiente, de manera que los porcentajes mayores se apreciaron a 45°C. No obstante, dado que en la clínica la temperatura máxima tolerada y permisible en la administración a pacientes es de 42°C a 43°C, el estudio se centró en la evaluación del efecto a 42°C. Las poblaciones celulares tras ser sometidas al efecto de una temperatura de 42°C, mostraron una disminución estadísticamente significativa en su viabilidad, pero no relevante desde el punto de vista clínico. El efecto resultó menos acusado en las líneas celulares correspondientes al mesotelioma, por lo que se sugiere un cierto grado de resistencia a la hipertermia en este tipo de neoplasias, en comparación con los otros tipos celulares. La adicción de cisplatino en concentraciones de 1, 2 y 4 $\mu\text{gr/ml}$, evidenció resultados similares a la hipertermia aislada con una respuesta dosis-dependiente, de manera que incrementos en la dosis de citostático inducían mayor decremento en la supervivencia celular. Las combinaciones de cisplatino con otro fármaco, demostraron mayor efecto que la adicción de cisplatino aislado. Las conclusiones más significativas del estudio son las siguientes: 1.- algunas líneas celulares del mesotelioma presentarían termorresistencia, 2.- el nivel de hipertermia requerido para una mayor efectividad sería el de 45°C, lo cual es inviable en la práctica clínica por la toxicidad asociada a dicha temperatura y 3.- al igual que en el tratamiento sistémico, la quimioterapia con diferentes combinaciones de fármacos resulta más efectiva que la monoterapia.

Los autores afirman que no sería posible aún establecer un protocolo óptimo de aplicación de quimioterapia hipertérmica intrapleural en la clínica, dado que resulta difícil proponer una determinada temperatura, tiempo de exposición, tipo y dosis de citostático.

En último lugar referiremos de manera resumida la metodología y resultados del estudio experimental realizado por el Grupo de Investigación de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, encaminado a determinar los efectos de la hipertermia y los citostáticos (cisplatino), en lo que a la inducción de apoptosis celular se refiere, en células pleurales sanas de origen murino. Dicho estudio sirvió como punto de partida para el posterior desarrollo del presente trabajo y sus resultados y conclusiones han sido publicitados a nivel nacional e internacional^{43, 44, 45, 46}.

En el citado trabajo se procedió al lavado durante 2 minutos de la cavidad pleural de ratones eutímicos con suero fisiológico tamponado (PBS). Posteriormente se procedió a la recogida del mismo en medio estéril, conteniendo células de descamación pleural murinas. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Biología y Genética Molecular, y tras el centrifugado y eliminación de la escasa contaminación hemática, se procedió a la recogida del pellet celular. Las células fueron sometidas durante un tiempo de exposición de dos horas a temperaturas de 37°C, 40°C y 42°C con y sin adicción de cisplatino en una concentración de 33,7 picogramos por mililitro. En todas las condiciones establecidas se determinó el porcentaje de apoptosis y necrosis celular mediante técnicas de tinción con fosfatidil serina y anexina V-FICT. Así mismo, se determinó la expresión de determinadas citocinas pro-inflamatorias (Rantes, G-CSF, MIP-2, IL-6, IL-10, sTNFR) en el sobrenadante del cultivo celular utilizando el kit RayBio® Mouse Inflammation Antibody Array II de RayBiotech Inc. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la temperatura aislada incrementaba el porcentaje de apoptosis, con un efecto máximo a los 40°C, y que el efecto sinérgico de la temperatura y el cisplatino aumentaba el porcentaje de apoptosis y de necrosis celular.

Igualmente pudieron constatarse cambios significativos en la expresión de la mayoría de las citocinas pro-inflamatorias, lo cual indicaría que la hipertermia y los citostáticos inducen cambios en el metabolismo celular.

4.- Estrategia terapéutica en la quimioterapia hipertérmica intrapleural. Inducción de apoptosis en las células neoplásicas

4.1.- Justificación de la investigación en quimioterapia hipertérmica intrapleural

La infiltración pleural por células malignas, bien en el contexto de una enfermedad diseminada (metástasis pleurales de diversas neoplasias primarias) o relacionada con un tumor pleural primario (mesotelioma maligno), condiciona un pobre pronóstico vital acompañado en la mayoría de las ocasiones de síntomas que empeoran notablemente la calidad de vida de los pacientes.

Los resultados de las diversas modalidades de tratamiento empleadas en la actualidad son pobres, y en la mayor parte de las ocasiones se administran con intención paliativa, encaminados únicamente al control de síntomas. Se hace por tanto necesaria la investigación de nuevas vías de ataque a las células tumorales, que permitan establecer tratamientos con potencial intención curativa, capaces de mejorar el control de la enfermedad y por ende la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

Una de las terapias más prometedoras es la quimioterapia local (intrapleural) asociada a hipertermia. En este sentido, los estudios y ensayos realizados en la última década son numerosos, aunque sus resultados, en casi todos los casos, son contradictorios. Ello probablemente es debido al escaso tamaño muestral de la mayor parte de los mismos, así como a la gran heterogeneidad en lo que se refiere a la metodología y esquemas terapéuticos ensayados. Resulta evidente que existe una importante variedad en lo referente a las patologías tratadas, fármacos administrados, tiempo de exposición y temperatura empleados en cada uno de ellos, así como también en la asociación o no a resección quirúrgica o administración de tratamientos oncológicos sistémicos complementarios.

La administración intracavitaria de agentes quimioterápicos se acompaña de una exposición homogénea de la superficie mesotelial a los mismos, asociando también la ventaja de poder aplicar una concentración elevada del fármaco a nivel local con escasos efectos sistémicos. Por otra parte, aunque el mecanismo básico del daño celular secundario a la hipertermia aún no se ha establecido claramente, diversos estudios parecen demostrar que el aumento de temperatura puede inducir apoptosis en diversos tipos de células neoplásicas. Así mismo, la hipertermia tendría un efecto sinérgico con los fármacos, aumentando su citotoxicidad e incrementando la capacidad de penetración de las drogas. Todo ello parece reforzar los resultados prometedores registrados por algunos grupos de investigación^{47,48,49,50}.

No obstante aún son muy escasos los datos de los que se dispone en lo que a las bases biomoleculares y el mecanismo de acción de dicha terapéutica se refiere. Como se ha podido comprobar, existen pocos estudios experimentales en los que se haya determinado el efecto a nivel celular de la administración de hipertermia y citostáticos. Por ello los ensayos de estas terapias realizados en pacientes se han llevado a cabo de forma empírica y sin que el mecanismo de acción estuviese claramente establecido.

4.2.- Objetivos de la quimioterapia hipertérmica intrapleural. Inducción de apoptosis en las células neoplásicas

El efecto perseguido por las nuevas terapias en desarrollo para el control de la afectación maligna de la pleura, debería ser el de eliminar el mayor número posible de células tumorales mediante un proceso que asocie un escaso porcentaje de efectos secundarios tanto a nivel local como sistémico, evitando en lo posible la lesión de los tejidos sanos adyacentes. En este sentido, la inducción de apoptosis en las células neoplásicas sería el método idóneo para cumplir este objetivo.

Existen dos formas de muerte a nivel celular: la necrosis y la apoptosis. La necrosis es una forma de muerte accidental, un proceso desordenado e independiente de energía, secundario a una agresión mecánica o tóxica.

En el caso de la necrosis, las células y sus orgánulos se hinchan debido a la alteración en la capacidad de la membrana para controlar el paso de agua e iones, produciéndose ruptura (citolisis) y liberación de todo el material citoplasmático al espacio intercelular, lo que conlleva efectos asociados en el medio y células adyacentes, fundamentalmente fenómenos inflamatorios y necróticos a nivel tisular⁵¹. La apoptosis es una muerte celular programada, un proceso fundamental en la homeostasis tisular, cuya misión es eliminar células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. En este tipo de muerte celular existe activación de un programa intrínseco, caracterizándose por un mantenimiento íntegro de las membranas celulares y la eliminación de las células por fagocitosis, sin que se produzca repercusión alguna en el medio adyacente⁵².

4.2.1.- El proceso de apoptosis celular y sus mediadores biomoleculares. Proteínas implicadas en el proceso apoptótico.

Las células en apoptosis presentan una morfología característica con condensación citoplasmática y nuclear, rotura de proteínas celulares específicas, fragmentación en cuerpos apoptóticos (que serán fagocitados por macrófagos o células vecinas) y rotura endolítica del ADN. Las señales que pueden inducir a una célula a entrar en apoptosis son múltiples, e incluyen el daño celular secundario a radiaciones ionizantes, infección vírica o señales extracelulares. La apoptosis es mediada por mecanismos celulares intrínsecos que desencadenan una cascada de cambios morfológicos y bioquímicos intracelulares dependientes de energía, que finalmente provocan la muerte y eliminación de la célula⁵².

Las células que han sido inducidas a entrar en apoptosis disminuyen su tamaño, abren sus mitocondrias permitiendo la salida de Citocromo C, degradan la cromatina (ADN y proteínas) nuclear, se fragmentan en cuerpos apoptóticos y finalmente la fosfatidil serina, que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en superficie y se une a receptores de células fagocitarias que eliminan los cuerpos apoptóticos y segregan citoquinas que inhiben la inflamación. Por tanto, la apoptosis es una muerte celular ordenada y programada que conduce a la eliminación de las células no deseadas, sin repercutir en el resto de la estructura tisular circundante. De esta manera, inducir la apoptosis de las células tumorales presentes en la pleura, sería un método ideal de eliminación del componente neoplásico y de control de la enfermedad subyacente⁵².

Según Elmore⁵³, la apoptosis puede definirse como un proceso coordinado y dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas caspasas, así como una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula. En este proceso se producen una gran cantidad de interacciones proteicas que finalmente conducen a la efectiva degradación de la célula para que pueda ser “reciclada” por otras células.

Las señales que pueden inducir a una célula a entrar en apoptosis son muy diversas: niveles elevados de oxidantes, lesiones del ADN, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterápicos... etc. La apoptosis se fundamenta en dos tipos de proteasas especializadas: las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Dichas caspasas son cisteín proteasas que se expresan como zimógenos inactivos que se activan mediante proteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras, siendo la activación de dichas caspasas una etapa crucial para el inicio y activación de la apoptosis, sea cual sea el estímulo desencadenante⁵².

Las caspasas son sintetizadas como procaspasas y adquieren su actividad mediante proteólisis. Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas en mamíferos que se clasifican en tres grupos en base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades. En el grupo inflamatorio se incluyen las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14. El grupo iniciador de la apoptosis comprende a las caspasas 2, 8, 9 y 10 y en el grupo efector o ejecutor de la apoptosis encontramos a las restantes: 3, 6 y 7. Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen un pro-dominio largo en el que se encuentra el dominio efector de muerte (DED) y el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), que median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores, desempeñando un importante papel en la activación de las procaspasas. La capacidad proteolítica de las caspasas activas origina la degradación de diversas proteínas, originando la reorganización del citoesqueleto, la supresión de contactos con células vecinas, activación de endonucleasas y fragmentación del ADN, expresión de señales de fagocitosis (fosfatidil serina) y preparación de la célula para el cese de sus funciones metabólicas.

De forma general existen dos vías para la activación de las caspasas, la mediada por ligandos que se unen a receptores de la superficie celular y la mediada por estrés celular o alteraciones del ADN. Aunque la transducción de señales es diferente, ambas vías, denominadas extrínseca e intrínseca respectivamente, pueden solaparse.

La apoptosis iniciada por señales internas, apoptosis por estrés o vía intrínseca o mitocondrial, es iniciada por la salida del Citocromo C de la mitocondria. En la actualidad no existe consenso en cuanto a los mecanismos de lesión mitocondrial, pero si parece claro que la activación de la proteína proapoptótica Bax (mediada por p53), puede servir para explicar las alteraciones mitocondriales secundarias al estrés.

Se ha demostrado que Bax se asocia al complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), que participa en la regulación del calcio, el pH, el potencial de membrana y el volumen de la mitocondria. Esta proteína proapoptótica (Bax) induce la apertura del poro y la salida de diversos factores apoptóticos, entre los que encontramos al citocromo C que inicia la activación de las caspasas, Smac/Diablo y HTRA2/Omi, que bloquean la acción de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), como son cIAP1, cIAP2 y XIAP. De este modo las IAP actúan como reguladores negativos al bloquear la actividad de las caspasas, mientras que Smac/Diablo y HTRA2/Omi ejercerían una función proapoptótica^{51,52}.

En la actualidad se sabe que las proteínas reguladoras de los cambios estructurales de la membrana mitocondrial pertenecen a la familia Bcl-2 y que pueden tener funciones proapoptóticas y antiapoptóticas. Las proteínas de la familia Bcl-2 son controladas por la proteína supresora de tumores p53. Entre las proteínas con función proapoptótica encontramos a Bax, Bak, Bid, Bad y Bcl-10. Entre las antiapoptóticas, a Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL y BAG. La membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 en superficie y ésta se une a una molécula de proteína denominada Apaf-1. El estímulo que provoca la alteración en el equilibrio de la célula, origina que la mitocondria libere Citocromo C, al mismo tiempo que Bcl-2 deja libre a Apaf-1. En el citosol el Citocromo C se une al terminal C del Apaf-1, que finalmente inicia la activación de la caspasa-9, originándose una cascada expansiva que conlleva a la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, degradación del ADN cromosómico y fagocitosis de los cuerpos apoptoicos^{51,52}.

La apoptosis inducida por señales externas, vía extrínseca o apoptosis mediada por receptor, se inicia con la activación de uno de los denominados receptores de muerte, de los cuales los más conocidos son el Fas y el TNFR1. Los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF) poseen diversas funciones además de la de ser apoptogénicos. La unión del TNF ligando al TNF receptor y a receptores CR4 y CR5, reclutan moléculas adaptadoras como FADD, que activan a las caspasas iniciadoras 8 y 10, desencadenando la activación final de caspasas efectoras o ejecutoras (3,6 y 7).

De manera paralela, la caspasa 8 es capaz de activar la vía mitocondrial o intrínseca, al activar la proteína Bid e inducir la salida de Citocromo C. El adaptador intracelular TRADD o dominio de muerte asociado al TNFR, puede también asociarse con FADD e inducir la apoptosis por reclutamiento y rotura de la procaspasa 8, mediante la unión de la pro-caspasa 8 al dominio efector de muerte que posee FADD^{51,52}.

El miembro prototipo de la familia Bcl-2 es un oncogen identificado en células B de la leucemia (B cell leukemia). El hecho de que existan proteínas pro y antiapoptóticas dentro de las Bcl-2, indica que miembros de la misma familia pueden actuar como oncogenes o como genes supresores de tumores. Las Bcl-2 se dividen en tres grupos en función de los dominios BH (Bcl-2 Homology) que las integran. Las que comparten homología en los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 (como Bcl-2 y Bcl-XL), tienen función antiapoptótica y oncogénica. Las que comparten homología de dominios BH1, BH2 y BH3 (como Bax y Bak), ejercen como proteínas proapoptóticas. La expresión de Bax está en parte regulada por la proteína supresora de tumores p53⁵².

4.2.2.- Proteínas citoprotectoras. Proteínas de shock térmico

Las proteínas de shock térmico (Hsp - Heat shock proteins -) o proteínas anti-estrés, pertenecen a una familia de proteínas altamente conservada que se encuentra de forma constitutiva en la mayoría de células pro y eucariotas. La agresión por diversos factores ambientales origina la sobreexpresión de estas proteínas, así como la inducción de expresión de otras pertenecientes a esta familia que no son constitutivas, minimizando así el daño celular. Su función por tanto, es contribuir al mantenimiento y estabilidad de la integridad celular. Cuando el agente agresor desaparece las células continúan con su metabolismo normal. Sin embargo, si el estrés aumenta, la función citoprotectora de las Hsp se ve sobrepasada con lo que se detiene su producción y se activa la apoptosis. Además del factor térmico, la hipoxia, infecciones víricas, estados inflamatorios, presencia de neoplasias y otros factores, pueden activar la producción celular de las Hsp^{54,55}.

Las vías de restauración de la homeostasis celular en situaciones de estrés son múltiples, siendo la de las Hsp uno de los mecanismos mejor conocidos. También se conocen como proteínas chaperonas, término empleado para denominar a aquellas proteínas que acompañan a otras estabilizando formas inestables. Actúan mediante uniones y desuniones controladas, facilitando el ensamblado, la correcta unión de oligómeros y su transporte a otro compartimento celular. Esta cooperación entre diversas chaperonas crea una red de sinergismos encaminada al plegamiento de las proteínas celulares, manteniendo la homeostasis bajo condiciones no permisivas para los plegamientos espontáneos⁵⁴.

El estrés calórico interrumpe numerosos procesos metabólicos que conllevan la muerte de la célula si el estímulo es muy intenso o mantenido. Dicho estrés no sólo induce la síntesis de nuevas Hsp, sino la fosforilación de las preexistentes o constitutivas y de las formadas de novo.

Se ha observado que la exposición a un incremento suave de temperatura (subletal) aumenta la capacidad de las células para resistir un posterior estrés mayor con capacidad letal. Este fenómeno, conocido como termotolerancia, también ha sido descrito para otros tipos de agresiones como la hipoxia o la isquemia. La sobreexpresión de Hsp, confiere así mismo, protección contra los oxiradicales generados por algunas drogas anticancerígenas, siendo conocida la resistencia de las células neoplásicas que expresan Hsp27 a fármacos como la doxorubicina, colchicina y vincristina⁵⁴.

La superfamilia de las Hsp está compuesta por varias familias de proteínas, que se agrupan en base a sus pesos moleculares. Por convención, para nombrar a dichas proteínas, se emplea la letra H seguida de las letras s y p (Hsp), denominándose a los genes correspondientes, con la nomenclatura hsp.

Familia Hsp60: Estas proteínas ejercen su función en un medio ambiente protegido, del cual las proveen las mitocondrias. Cooperan en el plegado de proteínas, en la translocación de las mismas a través de membranas y en la aceleración del ensamblado.

Familia Hsp70: Se trata de la más conservada en la evolución y es constitutiva de los procesos de maduración de otras proteínas celulares, también participa en el transporte de las mismas, en la eliminación de proteínas desnaturalizadas y en la actividad de la ATP-asa, además de conferir protección al centrosoma y a los filamentos intermedios. Se ha comprobado que tras un shock térmico, las células acumulan Hsp70 en el nucléolo. La proteína Hsp70 ejerce su acción antiapoptótica mediante el secuestro de Apaf-1, impidiendo la formación del apoptosoma^{52,54}.

Familia Hsp27: Numerosas neoplasias de diversa estirpe presentan sobreexpresión de Hsp, principalmente de Hsp27. Ello podría relacionarse con la proliferación celular, el establecimiento de metástasis y la resistencia a algunos agentes antitumorales. Las células neoplásicas al migrar a los ganglios linfáticos y desarrollarse en un microambiente hostil, sobreexpresarían estas proteínas citoprotectoras, favoreciendo así su supervivencia y diseminación. Algunas de las funciones de la Hsp27 son conferir termotolerancia, inhibir la apoptosis y regular el desarrollo y diferenciación celular. Su efecto antiapoptótico es debido a su interacción con la membrana mitocondrial externa e interferencia en la activación del complejo Citocromo C-Apaf-1/dATP, con la consecuente inhibición de la activación de procaspasa-9⁵⁴.

La función y mecanismo de acción de las principales proteínas implicadas en la apoptosis que han sido determinadas en nuestro trabajo, se encuentra resumida en las tablas A y B de la sección *Tablas* y las figuras A y B de la sección *Figuras*.

Planteamiento del tema

En razón de lo expuesto en la introducción, resulta evidente que en la actualidad no es posible ofrecer un tratamiento que aporte resultados satisfactorios a los pacientes que presentan afectación neoplásica maligna a nivel de la pleura. Ello ha conducido a la aparición de múltiples líneas de investigación en los últimos años que intentan establecer nuevas opciones terapéuticas más eficaces en el control de la enfermedad, enfocadas principalmente en la terapia local intracavitaria a nivel pleural.

Queda demostrado que son múltiples los estudios de los que se dispone en lo referente al efecto de la hipertermia y los citostáticos a nivel intrapleural, y han sido realizados por diversos grupos de investigación. La mayor parte de los mismos cuentan con un escaso tamaño muestral y existe además una importante heterogeneidad en lo que al tipo de pacientes y esquemas terapéuticos empleados se refiere. Por este motivo, los resultados obtenidos son contradictorios y carentes de la capacidad necesaria para aportar datos que permitan la protocolización y aceptación de un determinado esquema terapéutico como el más adecuado.

Por otra parte, la escasez de estudios experimentales a nivel celular hace que en la actualidad el empleo de estas terapias se realice de manera empírica y sin que sus mecanismos de acción estén claramente establecidos. A pesar de que en algunos centros, fuera de nuestro país, se hayan comenzado a administrar recientemente este tipo de tratamientos a un escaso número de pacientes seleccionados, en la actualidad no existen niveles de evidencia científica suficientes que justifiquen su empleo.

Actualmente no existen datos definitivos que permitan establecer la temperatura ideal, el citostático de elección y el adecuado tiempo de exposición a dichos agentes.

Como ya se ha referido, los estudios realizados en esta línea por el grupo de investigación de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, fueron inicialmente llevados a cabo en un modelo de experimentación animal murino y centrados en la investigación de la producción de proteínas proinflamatorias y apoptosis en las células pleurales sanas, tras el estímulo citostático e hipertérmico.

Una vez efectuado el análisis de los resultados de dicho estudio, y teniendo en cuenta la escasez de datos respecto a los mecanismos de acción de este tipo de terapia a nivel celular, se planteó la investigación *in vitro* en las células pleurales tumorales del líquido pleural de pacientes con afectación neoplásica demostrada histológicamente de dicha serosa. En dicho estudio se planteó estudiar la respuesta de las células pleurales neoplásicas a la combinación de hipertermia y quimioterapia con cisplatino en distintas condiciones de temperatura, en lo que se refiere a la inducción de apoptosis celular y su señalización por diversas proteínas implicadas en el proceso apoptótico.

La citada investigación, su metodología y resultados, así como la discusión y conclusiones derivadas de la misma, son el objeto del presente trabajo.

Hipótesis de trabajo

Basándonos en todo lo anteriormente referido, nos planteamos la realización de un estudio experimental empleando el líquido pleural de pacientes con derrame pleural neoplásico, filiado etiológicamente mediante el análisis histológico de biopsias pleurales obtenidas tras la realización de una videotoracoscopia. En dicho estudio se tratarían de establecer los efectos a nivel de las células neoplásicas pleurales humanas de la hipertermia y los citostáticos, con el fin de obtener datos que pudieran fundamentar, con suficiente evidencia, la realización de estos tratamientos.

Teniendo en cuenta los resultados de las publicaciones existentes y del estudio experimental previo de este grupo de investigación, se estableció como hipótesis de trabajo la posibilidad de determinar la combinación más adecuada de temperatura y tiempo de aplicación de la quimioterapia intrapleural hipertérmica, mediante el estudio *in vitro* en las células existentes en el líquido pleural de pacientes afectados por neoplasias a dicho nivel. Para ello se determinarían en estas células la producción de apoptosis en distintas condiciones de temperatura y aplicación de cisplatino, así como la expresión de diversas proteínas implicadas en el proceso apoptótico.

De este modo trataremos de verificar la posible efectividad de la quimioterapia hipertérmica mediante el análisis de la respuesta *in vitro* de las células pleurales neoplásicas humanas, en lo que al proceso de apoptosis se refiere.

Pacientes y Métodos

1.- Consideraciones previas y diseño del estudio

Se planteó analizar el efecto *in vitro* de la hipertermia y la quimioterapia en las células presentes en el líquido pleural de pacientes afectados de derrame pleural secundario a patología neoplásica. La etiología del derrame de los pacientes fue constatada mediante la realización de una videotoroscopia y el análisis anatomopatológico de las biopsias pleurales y del líquido pleural (citología).

En razón de que los tipos de células presentes en el líquido pleural son múltiples y de estirpe diversa, con carácter previo a la determinación de apoptosis en las células del líquido pleural, se procedió a la señalización de las no neoplásicas (monocitos, neutrófilos, células NK, granulocitos y macrófagos), para garantizar la fiabilidad de los resultados.

A fin de poder determinar las condiciones en las que un líquido pleural sería apto para su inclusión en el estudio y el posterior procesamiento y análisis de las células pleurales en el laboratorio de biología y genética molecular (IBGM), fue realizado un número suficiente de ensayos previos que permitieron establecer las condiciones óptimas de volumen y contaminación hemática de las muestras.

2.- Población de estudio

2.1.- Criterios de inclusión

Los requisitos a cumplir por los pacientes para ser incluidos en el estudio fueron concretados en los siguientes:

- 1.- Presentar derrame pleural estimado en cuantía superior a un litro y sin confirmación de diagnóstico histológico.
- 2.- Necesidad de exploración pleural videotoracoscópica por motivo diagnóstico y/o terapéutico.
- 3.- Estado general adecuado y ausencia de contraindicaciones para la realización de videotoracoscopia.

En todos los pacientes habían sido realizados múltiples estudios diagnósticos previos, sin obtenerse un diagnóstico etiológico definitivo que permitiera establecer el tratamiento y pronóstico del proceso. De los estudios realizados, señalaremos como comunes a todos los pacientes TC, fibrobroncoscopia, y toracocentesis diagnóstica (análisis bioquímico, citológico y microbiológico del líquido pleural). En la mayor parte de los casos se realizó también TC-PET y biopsia pleural cerrada, previamente a la indicación de la videotoracoscopia. Así mismo todos los pacientes disponían de las correspondientes pruebas preoperatorias y valoración por parte de Anestesiología, que no contraindicaban el procedimiento quirúrgico.

El diseño y metodología del estudio fueron revisados y valorados por la Comisión de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, aprobando oficialmente su realización.

Para la propuesta a los pacientes de la posibilidad de su inclusión en el estudio se procedió a explicar de forma verbal al paciente y su familia las consideraciones para justificar su elección, la indicación y tipo de técnica quirúrgica a realizar, las muestras a obtener para su análisis histopatológico, las posibles complicaciones postoperatorias asociadas y/o derivadas del procedimiento y los posibles beneficios diagnósticos y terapéuticos de la realización del mismo. También fueron informados de que parte de las muestras recogidas durante la exploración videotoracoscópica serían empleadas para su estudio en el laboratorio del instituto de biología y genética molecular (IBGM), con el objetivo de esclarecer el comportamiento de las células pleurales patológicas frente a agentes terapéuticos citostáticos en distintas condiciones de temperatura.

De modo complementario se entregó a todos los pacientes un documento escrito informativo sobre el estudio experimental a realizar, así como los datos de contacto de los profesionales a los que podrían solicitar información adicional o consultar dudas.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento quirúrgico habitual para la realización de exploración videotoracoscópica y adicionalmente un consentimiento escrito autorizando su inclusión en el estudio y el empleo de parte de las muestras obtenidas para la investigación planteada.

Los modelos del documento informativo y del consentimiento escrito de inclusión en el estudio se encuentran en el apartado *Anexos* del presente trabajo.

2.2.- Características de los pacientes

Se incluyeron en el estudio 15 pacientes afectados de un derrame pleural sin filiación etiológica, condicionando la indicación de la realización de una exploración videotoracoscópica con fines diagnósticos y/o terapéuticos.

En cuanto al sexo de los pacientes se incluyeron 10 hombres y 5 mujeres con edades comprendidas entre los 52 y 82 años, con una edad media de 67,5 años. En 3 casos presentaban antecedentes de neoplasias previas correspondientes a adenocarcinoma de recto, adenocarcinoma de próstata y adenocarcinoma gástrico. En otros 2 casos se diagnosticó una neoplasia extratorácica de forma sincrónica al diagnóstico del derrame pleural, correspondientes a un adenocarcinoma de próstata y un adenocarcinoma de ovario respectivamente.

La presencia y frecuencia de otras patologías asociadas presentes en los pacientes quedan reflejadas en la tabla 1.

PATOLOGÍA PRESENTADA	NÚMERO DE PACIENTES AFECTOS
Hipertensión arterial	8
Ex tabaquismo	7
Dislipemia	5
Cirugía traumatológica	4
EPOC	3
Cirugía de vía biliar	2
Diabetes Mellitus tipo 2	2
Consumo de alcohol	2
Obesidad	2
Cardiopatía isquémica	1
Cardiopatía hipertensiva	1
Valvulopatía reumática	1
Fibrilación auricular	1
Tuberculosis pulmonar antigua	1
Esteatosis hepática	1
Episodio trombótico venoso periférico	1
Trastorno psiquiátrico	1
Psoriasis	1
Hipertensión pulmonar	1
Litiasis renal	1
Cirrosis	1

Tabla 1.- Patologías asociadas presentes en los pacientes del estudio.

El resultado del análisis anatomopatológico de las biopsias pleurales obtenidas mediante videotoracoscopia, permitió establecer la etiología del derrame como inflamatoria en 6 de los casos y neoplásica en los 9 restantes. En todos los casos en los que el diagnóstico histológico de la biopsia de pleura parietal concluyó malignidad, se comprobó la presencia de células neoplásicas en el líquido pleural (estudio citológico positivo para células malignas).

En los pacientes con derrame pleural de etiología neoplásica, la tipificación histológica resultó de afectación pleural metastásica en 5 casos y primitiva (mesotelioma pleural maligno) en los 4 restantes.

En los pacientes diagnosticados de un derrame pleural metastásico, el resultado del análisis anatomopatológico de las biopsias pleurales objetivó infiltración pleural por adenocarcinoma broncogénico en 2 casos y por adenocarcinoma ovárico, intestinal y de próstata, respectivamente, en los 3 casos restantes. Entre los afectos de mesotelioma pleural maligno, el subtipo histológico tipificado fue epitelioide en 2 casos y desmoplásico y túbulo-papilar en los 2 restantes.

En los 6 casos que presentaron un derrame pleural de origen inflamatorio, los hallazgos histológicos correspondieron a hiperplasia mesotelial reactiva en 3 casos y a pleuritis crónica granulomatosa, pleuritis fibrinosa e inflamación crónica inespecífica en los 3 restantes.

La etiología histológica de la afectación pleural queda resumida en las tablas 2 y 3.

TIPO DE NEOPLASIA PLEURAL	FRECUENCIA
METASTÁSICA	5
Adenocarcinoma broncogénico	2
Adenocarcinoma de ovario	1
Adenocarcinoma intestinal	1
Adenocarcinoma de próstata	1
PRIMITIVA	4
Mesotelioma epitelióide	2
Mesotelioma desmoplásico	1
Mesotelioma túbulo-papilar	1

Tabla 2.- Tipificación histológica de la afectación pleural neoplásica maligna.

PATOLOGÍA INFLAMATORIA	FRECUENCIA
Hiperplasia mesotelial reactiva	3
Pleuritis crónica granulomatosa	1
Pleuritis fibrinosa	1
Inflamación crónica inespecífica	1

Tabla 3.- Tipificación histológica de la afectación inflamatoria de la pleura.

3.- Metodología

3.1.- Obtención de muestras. Recogida y preservación del líquido pleural

En todos los casos los pacientes fueron sometidos a exploración quirúrgica videotoracoscópica de la cavidad pleural afecta bajo anestesia general. El colapso pulmonar en la cavidad pleural a explorar se realizó en todos los casos mediante intubación orotraqueal con tubo de doble luz.

La exploración videotoracoscópica se realizó según el esquema que se refiere a continuación.

- 1.- Toracocentesis a nivel del 8º espacio intercostal línea axilar media, localización de la cámara pleural e instilación de anestésico local (mepivacaína).
- 2.- Apertura cutánea en el mismo nivel de la toracocentesis, disección roma de planos musculares, perforación de la pleura parietal y emplazamiento de la puerta de entrada.
- 3.- Aspiración del líquido pleural mediante sonda flexible y jeringa de 60 cc. Recogida de las muestras para análisis anatomopatológico, microbiológico, bioquímico y biomolecular (experimentación).
- 4.- Preservación del líquido pleural a 4°C para su remisión inmediata al laboratorio de biología y genética molecular.
- 5.- Exploración videotoracoscópica de la cavidad pleural, objetivación de los hallazgos patológicos y toma de biopsias pleurales parietales múltiples para estudio anatomopatológico.

3.2.- Procesamiento de las muestras para su estudio anatomopatológico en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid

3.2.1.- Procesamiento del líquido pleural. Estudio citológico

Las muestras de líquido pleural fueron remitidas al laboratorio de Anatomía Patológica sin añadir ningún medio de fijación ni agentes anticoagulantes. Una vez recepcionadas se procedió a su estudio mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Se registraron sus características macroscópicas: volumen, color y densidad.
- 2.-Se procedió al procesamiento inmediato del mismo. El líquido sobrante se guardó en frigorífico a 4°C para su mantenimiento durante 10 días, ya que a dicha temperatura la conservación celular es óptima. No es posible la congelación del mismo, dado que se produciría la ruptura de la membrana celular.
- 3.-Se realizó citocentrifugación a 3000 revoluciones durante 10 minutos, obteniéndose posteriormente dos portaobjetos con muestra celular.
- 4.-Tras fijación de los mismos en alcohol de 95° durante al menos 30 minutos, se procedió a la tinción con técnica de Papanicolau y se dejaron secar.
- 5.-Se examinaron al microscopio realizando una descripción morfológica y se solicitaron las técnicas complementarias oportunas: colorimétricas o de inmunocitoquímica.
- 6.-Se emitió el correspondiente diagnóstico en los términos: negativo, sospechoso o positivo para células malignas.

3.2.2.- Procesamiento de las biopsias pleurales

Para obtener un diagnóstico con alto grado de seguridad, siguiendo las indicaciones de anatomía patológica, se procedió a la recogida de varias muestras pleurales. Una vez recepcionados los especímenes en el laboratorio correspondiente, se siguió el procedimiento que a continuación se refiere, con el objeto de conseguir un diagnóstico definitivo del proceso pleural.

- 1.-Fijación inmediata en formol al 10% de las piezas quirúrgicas durante un tiempo mínimo de 24 horas.
- 2.-Estudio macroscópico y descripción de las mismas incluyendo forma, tamaño, características especiales, color y consistencia.
- 3.-Tallado de las muestras e inclusión en parafina formando bloques.
- 4.- Obtención de cortes de las muestras (2 micras) y tinción con hematoxilina-eosina.
- 5.- Examen microscópico y descripción de los hallazgos histológicos.
- 6.- Solicitud de técnicas especiales colorimétricas y de inmunohistoquímica.
- 7.- Emisión de informe con resultado del proceso patológico subyacente.

3.3.- Procesamiento del líquido pleural para su estudio en el laboratorio de biología y genética molecular

El procesado y análisis de la muestras objeto del estudio *in vitro*, fue realizado en su totalidad en el laboratorio del IBGM de Valladolid.

En todos los casos las muestras cumplían las condiciones necesarias para poder realizar las determinaciones establecidas, que se fijaron en las siguientes: cuantía mínima de 1000 mililitros de líquido pleural con escasa contaminación hemática y la posibilidad de obtener un número mínimo de células de 6 millones por mililitro.

3.3.1.- Procesado inicial de las muestras

El primer paso consistió en trasvasar el líquido pleural a tubos tipo falcon, trabajando siempre en campana estéril para evitar la contaminación de las muestras.

Una vez trasvasada la totalidad del líquido pleural a dichos tubos, las muestras fueron centrifugadas a 1500 revoluciones durante 5 minutos a una temperatura de 37°C, con el fin de decantar las células presentes en el mismo. Al finalizar la centrifugación se procedió a eliminar el sobrenadante líquido manteniendo el pellet celular, el cual se resuspendió con RBC lysis buffer y se sometió a agitación suave durante 3 minutos a 37 °C de temperatura. El RBC lysis buffer está compuesto por 8,26 gramos de cloruro amónico (NH₄Cl), 1 gramo de bicarbonato potásico (KHCO₃) y 0,037 gramos de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) disueltos en 1 litro de agua destilada. El objetivo de resuspender el pellet celular con RBC lysis buffer es la eliminación de las células rojas sanguíneas (hematíes) presentes en la muestra y que pueden interferir con el proceso posterior de análisis de las muestras. En caso de comprobarse persistencia macroscópica de hematíes, la suspensión del pellet celular es nuevamente centrifugada en las mismas condiciones descritas con anterioridad, eliminándose de nuevo el sobrenadante y procediéndose a una nueva resuspensión con el RBC lysis buffer.

Tras la descontaminación hemática de la muestra se prosigue el procesamiento de la misma trabajando siempre en campana estéril. El pellet celular obtenido es resuspendido con PBS mediante una mezcla suave con pipeta. Tras homogeneizar la muestra se completa el volumen del tubo falcon hasta los 50 mililitros con este PBS y se centrifuga de nuevo, añadiéndose al pellet celular obtenido DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) suplementado con antibióticos, hasta obtener una concentración celular de 10 millones de células por mililitro.

A continuación la muestra es distribuida en 7 tubos, añadiéndose cisplatino a una concentración de 33,7 microgramos por mililitro en 3 de ellos. 6 de las muestras resultantes son incubadas durante un periodo de tiempo de 2 horas en las siguientes condiciones:

- 37°C sin cisplatino
- 40°C sin cisplatino
- 42°C sin cisplatino
- 37°C con cisplatino
- 40°C con cisplatino
- 42 °C con cisplatino

Transcurridos los 120 minutos, las células se resuspenden nuevamente en DMEM y se colocan en placas de cultivo que permanecerán durante 24 horas en estufa a una temperatura constante de 37°C.

La séptima muestra es preservada en congelación a -60 °C para emplearse como control en la determinación posterior de la expresión proteica.

3.3.2.- Procesado de las muestras tras 24 horas de incubación

3.3.2.1- Señalización celular

Con el objetivo de poder determinar el comportamiento de las células pleurales tumorales respecto de otros tipos celulares pleurales presentes en las muestras, las células fueron marcadas con los anticuerpos CD11b y DC-SIGN.

El CD11b pertenece a la familia de las integrinas y es expresado en superficie por diferentes tipos celulares incluyendo monocitos, neutrófilos, células NK, granulocitos y macrófagos. Funcionalmente el CD11b regula la adhesión leucocitaria y la migración como mediador de la respuesta inflamatoria. La tinción positiva para CD11b permite la señalización de granulocitos, macrófagos, células dendríticas foliculares, promielocitos, células NK y algunas células de tipo B y T.

El DC-SIGN es una proteína integral de membrana tipo II expresada únicamente por células dendríticas localizadas en tejidos situados en lugares de exposición a antígenos, como determinadas partes del tubo digestivo (boca, esófago, duodeno y colon), genitales femeninos (cérvix, vagina y endometrio), vía respiratoria (intersticio pulmonar, vaina conectiva broncovascular y pleura) y sangre periférica. Su función es mediar en la unión de las células T con las CD a través de moléculas de adhesión y regula la migración trans-endotelial de las células dendríticas desde el endotelio vascular hasta el tejido linfoide.

3.3.2.2- Determinación de apoptosis

Para la determinación de la apoptosis celular se empleó el marcado de las células con fosfatidil-anexin serina (V-FICT) y con yoduro de propidio (IP).

Dentro de los múltiples métodos *in vitro* que pueden emplearse para determinar apoptosis en las células, uno de los más utilizados consiste en la evaluación de las alteraciones de la membrana, siendo en este sentido uno de los ensayos más relevantes el de la anexina V conjugada con algún tipo de fluorocromo, como por ejemplo la fluoresceína (FICT). La anexina V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidil serina que se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática de las células apoptóticas.

Adicionalmente, la combinación de anexina V-FITC y el marcador yoduro de propidio (IP), se emplea para diferenciar las células apoptóticas de las necróticas, de manera que las células negativas para ambos marcadores serán células no apoptóticas, si presentan anexina V-FITC positiva e IP negativo se encontrarán en apoptosis temprana y la positividad de ambos indica necrosis celular.

3.3.2.3.- Procedimientos de marcaje y tinción celular para su diferenciación y cuantificación de apoptosis

Tras mantener las muestras en placas de cultivo en estufa a 37 °C durante 24 hs se realizaron los procedimientos encaminados a la señalización y diferenciación celular, así como las tinciones necesarias para la posterior determinación de la apoptosis.

Tras la recogida de las células, las muestras fueron bloqueadas con FBS y se mantuvieron durante 15 minutos en hielo. Posteriormente se realizó un lavado de las mismas con 1 mililitro de PBS y BSA, añadiéndose el anticuerpo primario (alfa-CD11b y alfa-CD-SIGN) en una concentración de 5 microgramos por marcador y muestra. Se mantuvo la incubación durante 30 minutos en hielo y posteriormente las muestras se centrifugaron a 6000 g durante 30 segundos.

Se realizó un nuevo lavado con 1 mililitro de PBS y BSA, para proceder a la incubación con el anticuerpo secundario: gamma y alfa-mouse-PE.

Tras incubación en hielo durante 20 minutos con el anticuerpo secundario, se hizo un lavado de las muestras con binding buffer y se procedió a la tinción con anexina V-FITC y con yoduro de propidio (incubación en hielo 10 minutos con concentraciones de 2 microlitros por marcador y muestra).

Finalmente se procedió a un último lavado de las muestras con binding buffer y resuspensión celular en 500 microlitros del mismo, para la inmediata cuantificación de apoptosis mediante técnica de citometría.

Las condiciones de las que se pudo disponer para cada muestra correspondieron a: anexina-IP, anexina-IP-gamma, anexina-IP-CD-11b, anexina-IP-DC-SIGN.

Para la determinación de la apoptosis celular se empleó un citómetro modelo Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter) y el software Kaluza Flow Cytometry Analysis Software.

3.3.3.- Determinación de la expresión de proteínas implicadas en el proceso de apoptosis

Para determinar las proteínas relacionadas con la apoptosis expresadas por las células recogidas y aisladas del líquido pleural, se empleó el Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit (referencia ARY009, R&D System). Dicho kit permite la determinación en una única muestra de la expresión relativa de 35 proteínas relacionadas con la apoptosis sin necesidad de equipación específica, mediante un método rápido y sensible.

En nuestro estudio centramos la investigación en la variabilidad de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas más relevantes del proceso apoptótico:

1.- Proapoptóticas: Citocromo C, Bad, Bax, Pro-Caspasa 3, FADD, Fas/TNFR-SF6, Smac/Diablo y HTRA2/Omi.

2.- Antiapoptóticas: XIAP, Bcl-2, Bcl-x, Hsp70, Hsp27 y Hsp60.

Tras *escraper* las células de la placa de cultivo se realizó un lavado con PBS y posteriormente la resuspensión de las mismas en 150 microlitros del buffer de lisis específico del kit, llevándolas a una concentración de 10 millones de células por mililitro. Tras una incubación de 30 minutos en hielo, se procedió a la microcentrifugación de la muestra a 14.000 g durante 5 minutos, obteniéndose el sobrenadante necesario para la cuantificación proteica (extracto proteico (EP)). Dicho sobrenadante se conservó a -80 °C hasta el procesamiento del mismo.

Las correspondientes muestras de los extractos proteicos fueron incubadas según las instrucciones específicas del Array y tras la obtención de un film con los resultados de cada muestra procesada se llevó a cabo el análisis de los datos obtenidos.

Las señales positivas tras el revelado del film son identificadas con facilidad mediante la colocación de la plantilla del kit sobre la imagen obtenida, alineándola con los puntos de referencia de las tres esquinas del Array. La densidad en pixels del film revelado es recogida y analizada mediante el empleo de un scanner en modo transmisión y un software específico de análisis de imagen, el cual permite:

- La creación de una plantilla para el análisis de la densidad en pixels de cada punto del Array.
- La exportación de los valores de señal a un archivo tipo “*spreadsheet*” para su tratamiento en un programa tipo Microsoft Excel.
- La determinación de la media de señal (densidad de pixels) de cada par de puntos que representan cada proteína relacionada con la apoptosis.
- La comparación de las señales correspondientes de diferentes Arrays para poder determinar el cambio relativo de los niveles de proteínas entre las diferentes muestras.

4.- Tratamiento estadístico

Al tratarse de un estudio con medidas intrasujeto, el análisis se realizó mediante el procedimiento GLM Repeated Measures de SPSS Statistics. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño muestral para los diferentes subgrupos, la significación estadística se obtuvo mediante la prueba no paramétrica de Friedman, considerándose significativo desde el punto de vista estadístico un valor $p < 0,05$.

Resultados

1.- Consideraciones previas

Para poder evaluar la mayor o menor sensibilidad de las células neoplásicas al efecto de la hipertermia y agentes citostáticos, en términos de apoptosis celular, se decidió comparar su comportamiento con el de otro grupo de células sometido a las mismas condiciones experimentales. Para ello se procesaron 6 líquidos pleurales de pacientes con diagnóstico citológico y anatomopatológico final de proceso pleural inflamatorio. Con estas muestras se siguió el mismo esquema que con las de líquidos pleurales neoplásicos, en lo que al procedimiento de señalización y tinción celular se refiere, para la cuantificación de apoptosis celular.

Tras señalar las células con CD-11b y DC-SIGN pudieron diferenciarse las células neoplásicas de los granulocitos, macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas y células NK presentes en el líquido pleural. Dicha diferenciación resultó fundamental para poder cuantificar el porcentaje de apoptosis celular correspondiente a las células tumorales, tras ser sometidas a incremento de temperatura de 37°C a 40°C y 42°C y a la adicción de un agente citostático (cisplatino).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio previamente realizado por este grupo de investigación en el modelo murino, - constatación de un mayor porcentaje de necrosis celular que de apoptosis con la elevación de la temperatura a 42°C -, y la posibilidad del incremento de los efectos nocivos sobre las células de los tejidos sanos de los pacientes por la elevación de la temperatura a 42°C, se decidió evaluar los cambios en la expresión de las proteínas relacionadas con el proceso apoptótico en las células neoplásicas, en las condiciones de temperatura de 37°C y 40°C, sumada o no la adicción de cisplatino.

2.- Determinación de la apoptosis celular

De manera global pudo objetivarse un aumento en el porcentaje de apoptosis en todos los tipos celulares en relación con el aumento de temperatura desde 37°C a 40°C y 42°C.

Al valorar el efecto de la hipertermia en las células inflamatorias, la mediana del porcentaje de apoptosis hallada a 37°C se consideró como la unidad (valor igual a 1) y se tomó como referencia para estimar el aumento porcentual de apoptosis celular a 40°C y 42°C. Las medianas obtenidas en estas dos condiciones fueron respectivamente de 1,67 y 1,33, resultando los cambios observados estadísticamente significativos ($p=0,006$).

En cuanto a la respuesta en términos de apoptosis de las células inflamatorias sometidas a la acción conjunta de la hipertermia y el citostático, se comprobó también aumento porcentual de la misma en relación al incremento de la temperatura. Valores de 1,34, 1,91 y 2,08 fueron los hallados respectivamente para las condiciones de 37°C, 40°C y 42°C con adicción de cisplatino ($p=0,012$).

De modo semejante al empleado para el análisis de las células inflamatorias se procedió con las células neoplásicas. La mediana del porcentaje de apoptosis registrado en las células neoplásicas a 37°C (apoptosis espontánea) fue considerado el dato de referencia o basal, y se equiparó a la unidad (valor igual a 1). Con la elevación de la temperatura de las muestras a 40°C y 42°C, se apreció un incremento en el porcentaje de apoptosis hallado en las células tumorales, con valores de 1,11 y 1,25 respectivamente, si bien dicha variación no resultó estadísticamente significativa ($p= 0,165$).

RESULTADOS

Al analizar la respuesta celular tras la adición de cisplatino, se objetivó un aumento de la apoptosis con valores de 1,43, 1,80 y 1,59 para las temperaturas de 37°C, 40°C y 42°C respectivamente, siendo su variación en este caso estadísticamente significativa ($p=0,014$).

La representación de los datos referidos queda expresada en la tabla A

Condiciones	Células Inflamatorias		Células Tumorales	
	Mediana Apoptosis	Friedman test p	Mediana Apoptosis	Friedman test p
<i>Sin Cisplatino</i>				
37°C	1	0.006	1	0.165
40°C	1.67	0.006	1.11	0.165
42°C	1.33	0.006	1.25	0.165
<i>Con Cisplatino</i>				
37°C	1.34	0.012	1.43	0.014
40°C	1.91	0.012	1.80	0.014
42°C	2.08	0.012	1.59	0.014

Tabla A.- Porcentaje de apoptosis celular en células inflamatorias y células neoplásicas tras la acción de la hipertermia y el cisplatino.

3.- Determinación de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en las células pleurales neoplásicas

3.1.- Familia de las proteínas Bcl-2

En lo que se refiere a la familia de las proteínas Bcl-2, fue determinada la expresión de Bcl-2, Bad, Bax y Bcl-x, apreciándose el siguiente comportamiento:

Con el aumento de temperatura de 37°C a 40°C, se pudo apreciar un descenso porcentual de expresión de la proteína proapoptótica Bad (-14%) y de la antiapoptótica Bcl-2 (-12,2%). Así mismo, se objetivó estabilidad de la proapoptótica Bax (-0,45%) e incremento en la antiapoptótica Bcl-x (+16,3%).

El análisis de la expresión proteica de las muestras a 37°C y 37°C con adicción de cisplatino, evidenció el descenso porcentual, por el efecto del citostático, en la expresión de todas las proteínas de la familia Bcl-2: Bad (-11%), Bax (-6,7%), Bcl-x (-31,3%) y Bcl-2 (-30,5%).

La comparación de las muestras a 37°C+cisplatino y 40°C+cisplatino, apreció un importante incremento en la expresión de la totalidad de las mismas: Bad (+203%), Bax (+253%), Bcl-2 (+229,6%) y Bcl-x (+363,3%).

Al comparar la expresión proteica en la situación basal con la presente tras el efecto de la hipertermia y el citostático (muestras a 37°C y a 40°C+cisplatino), se objetivó igualmente un importante incremento de todas las proteínas de esta familia: Bad (172,4%), Bax (229,7%), Bcl-2 (129,37%), Bcl-x (218,36%).

El compendio de los resultados de las variaciones de la expresión proteica referida a las proteínas de la familia Bcl-2, quedan expresados en la Tablas B y C y en las Figuras 1 a 4.

RESULTADOS

PROTEINA	37°C	40°C	37°C+Cisp	40°C+Cisp
Bad	174	149	156	474
Bax	239	238	223	788
Bcl-2	286	251	199	656
Bcl-x	147	171	101	468

Tabla B.- Concentración proteínas de la familia Bcl-2

PROTEINA	% variación 37°C/40°C	%variación 37°C/37°C+Cisp	% variación 37°C+Cisp/40°C+Cisp	% variación 37°C/40°C+Cisp
Bad	-14,3%	-11%	+203%	+172,4%
Bax	-0,45%	-6,7%	+253%	+229,7%
Bcl-2	-12,2%	-30,5%	+229%	+129,3%
Bcl-x	+16,3%	-31,3%	+363,3%	+218,3%

Tabla C.- Variaciones porcentuales en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2

RESULTADOS

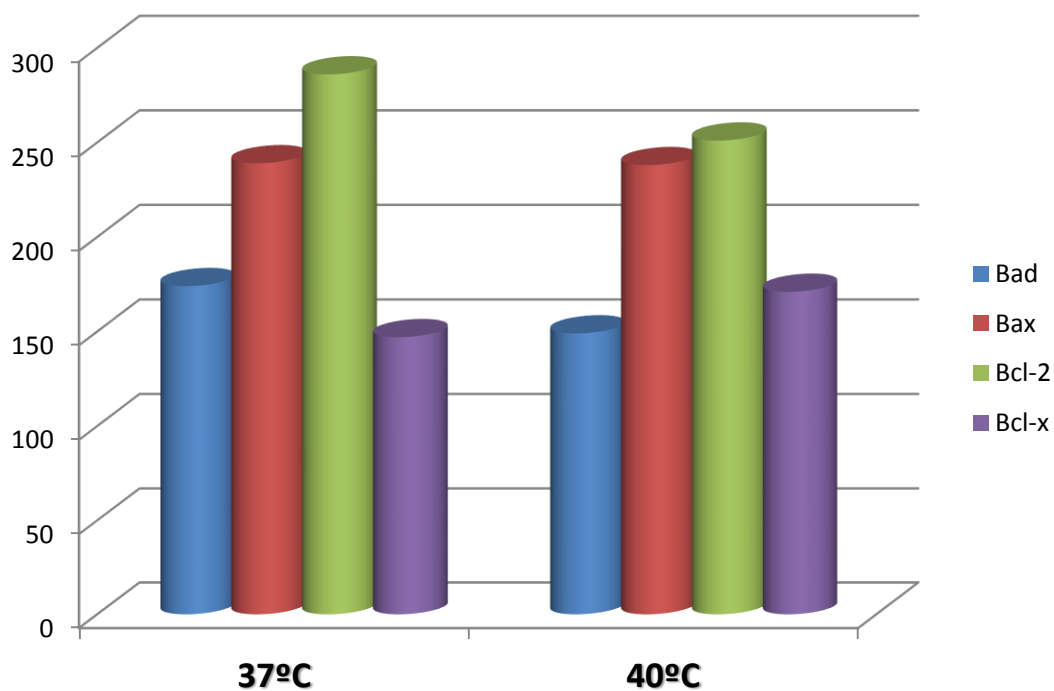


Figura 1.- Variación en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 de 37°C a 40°C

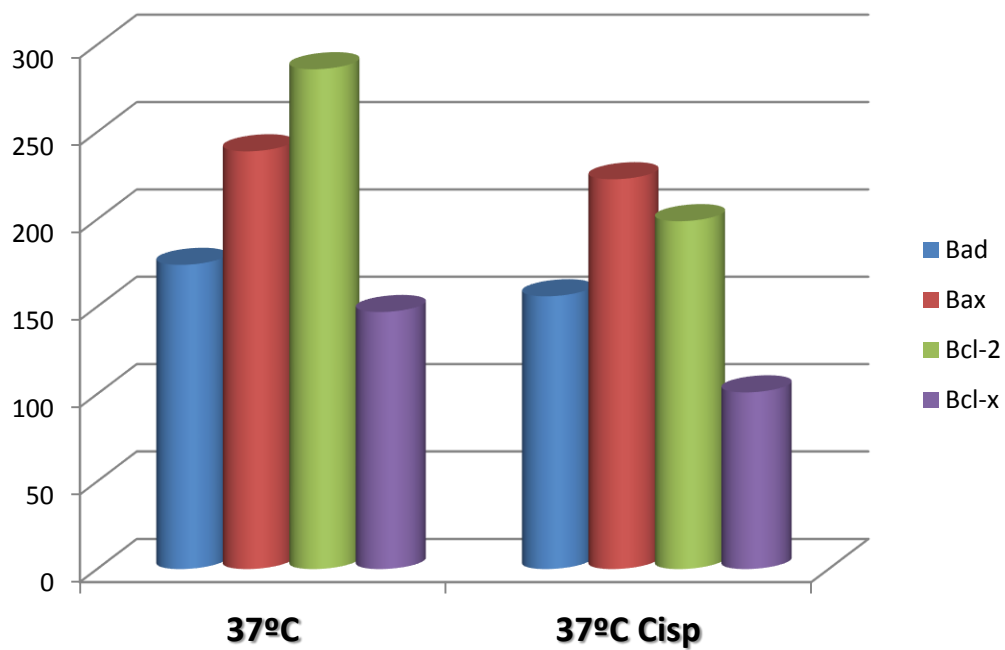


Figura 2.- Variación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 de 37°C a 37°C+Cisplatino

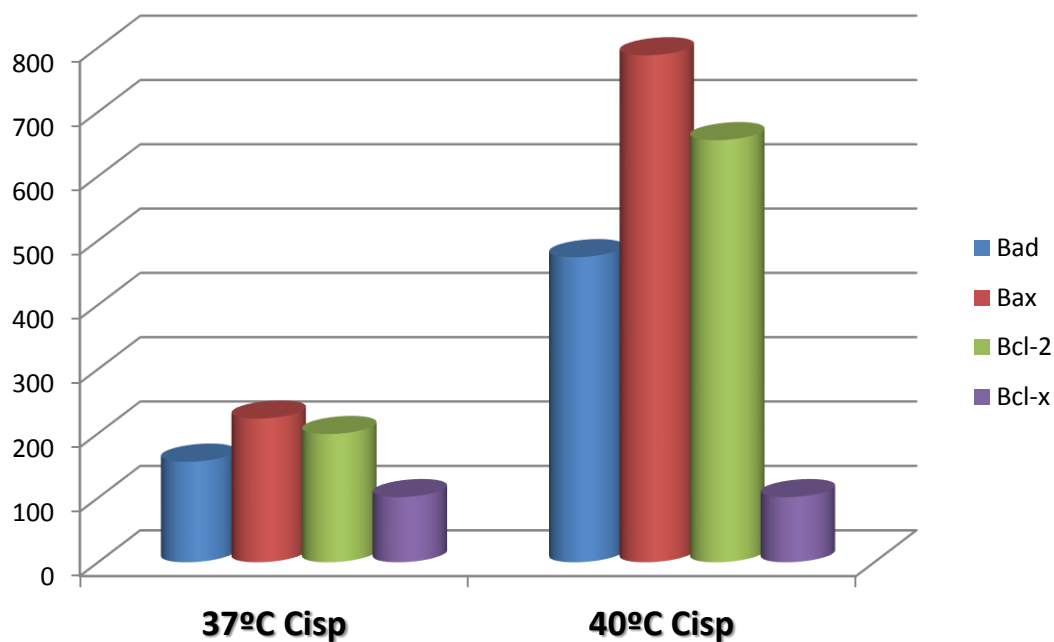


Figura 3.- Variación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 de 37°C+Cisplatino a 40°C+Cisplatino

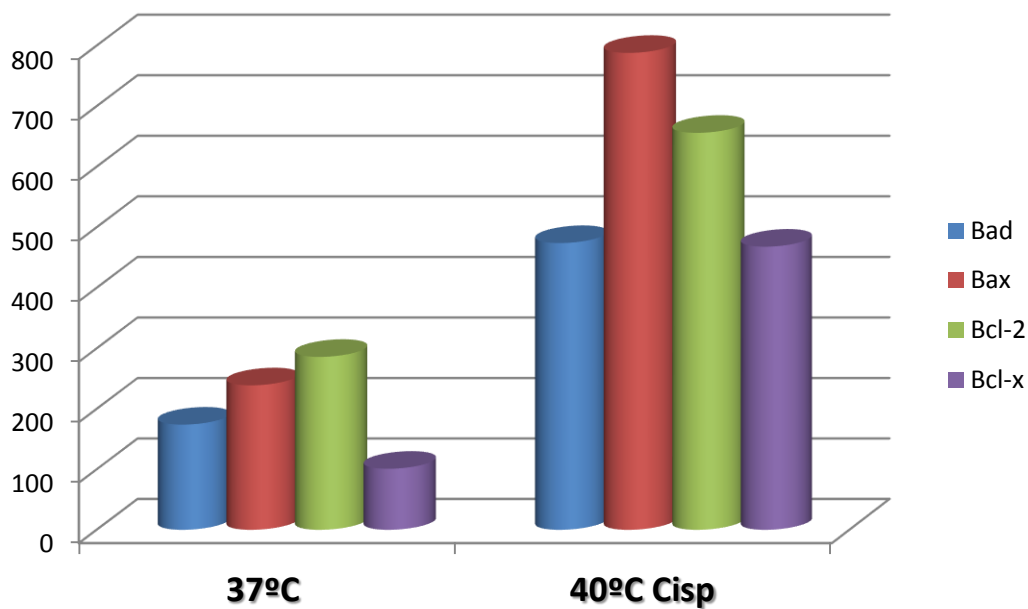


Figura 4.- Variación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 de 37°C a 40°C+Cisplatino

3.2.- Las proteínas de choque térmico. Familia Hsp

Se determinaron Hsp27, Hsp60 y Hsp70 calificadas como proteínas citoprotectoras y por lo tanto con cierto grado de efecto antiapoptótico.

Con el aumento de temperatura de las muestras de 37°C a 40°C, se pudo constatar un leve descenso porcentual en la expresión de Hsp27 (-5,2%) y Hsp70 (-4,9%) e incremento de Hsp60 (+31,1%).

Al determinar la expresión proteica de las muestras a 37°C y 37°C con adicción de cisplatino, se apreció un descenso porcentual de la expresión de Hsp27 (-30,3%) y Hsp60 (-11,8%) e incremento importante para Hsp70 (+89,8%), por la acción del citostático.

La comparación de las muestras 37°C+cisplatino y 40°C+cisplatino, permitió constatar una elevación de la expresión porcentual de todas las proteínas de la familia Hsp: Hsp27 (+41,8%), Hsp60 (+1,8%), Hsp70 (+17,8%).

El análisis de las tasas de expresión proteica a 37°C (basal) y a 40°C+cisplatino, evidenció un leve descenso de Hsp27 (-1,1%), una disminución algo más acusada para Hsp60 (-10,2%) e incremento importante de Hsp70 (+223,7%).

El compendio de los resultados de las variaciones de la expresión de las proteínas de la familia Hsp, quedan expresados en la Tablas D, E y las Figuras 5 a 8.

RESULTADOS

PROTEINA	37°C	40°C	37°C+Cisp	40°C+Cisp
Hsp27	192	182	134	190
Hsp60	196	257	173	176
Hsp70	345	328	655	772

Tabla D.- Concentración proteínas familia Hsp

PROTEINA	% variación 37°C/40°C	% variación 37°C/37°C+Cisp	% variación 37°C+Cisp/40°C+Cisp	% variación 37°C/40°C+Cisp
Hsp27	-5,2%	-30,3%	+41,8%	-1,1%
Hsp60	+31,1%	-11,8%	+1,8%	-10,21%
Hsp70	-4,9%	+89,8%	+17,8%	+223,7%

Tabla E.- Variaciones porcentuales en la expresión de proteínas de la familia Hsp

RESULTADOS

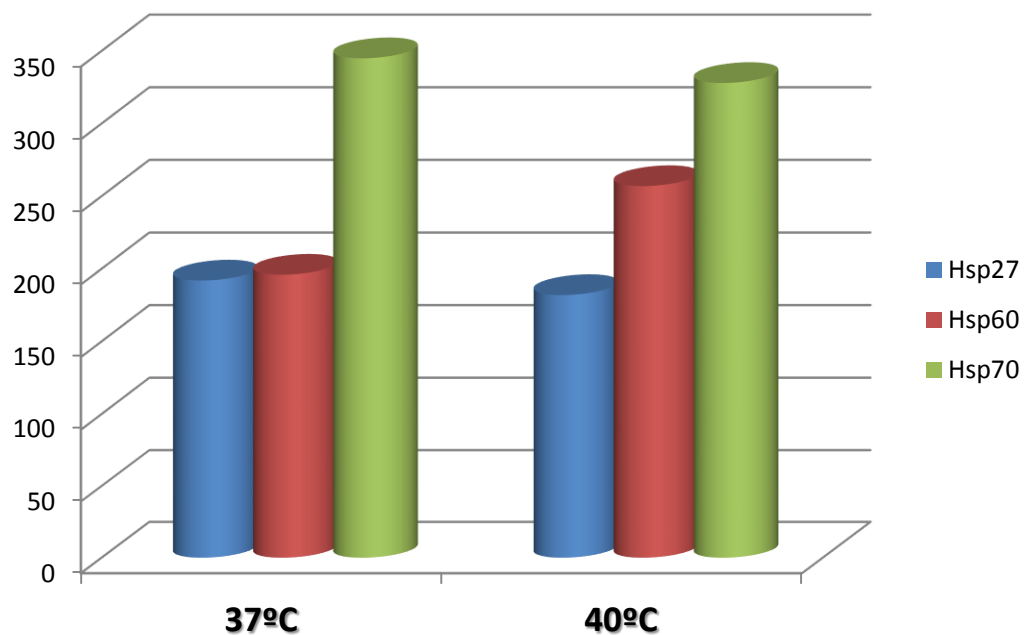


Figura 5.- Variación en la expresión de proteínas de la familia Hsp de 37°C a 40°C

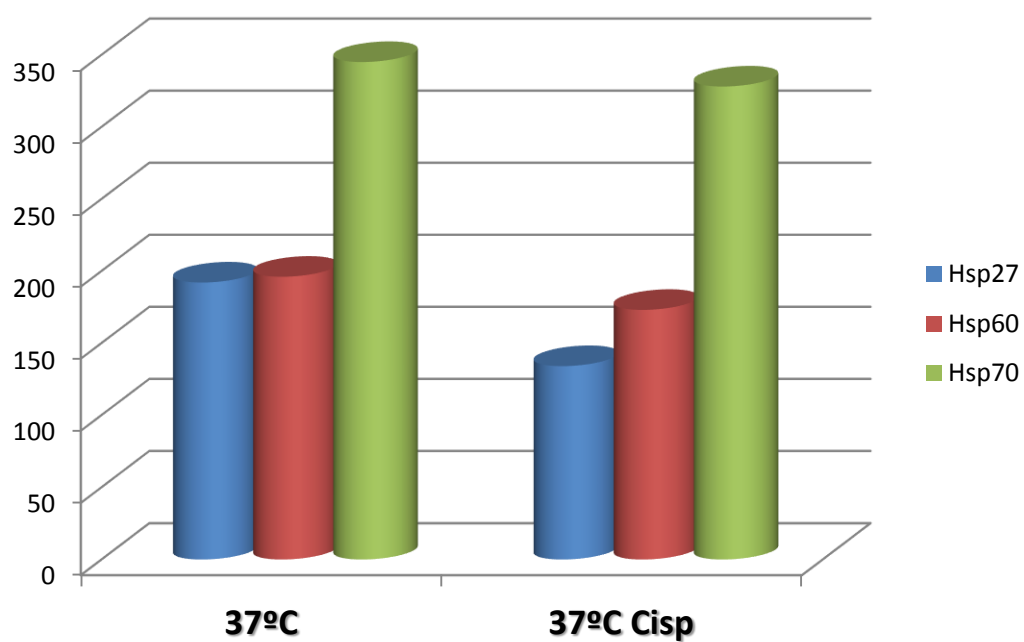


Figura 6.- Variación en la expresión de proteínas de la familia Hsp de 37°C a 37°C+Cisplatino

RESULTADOS

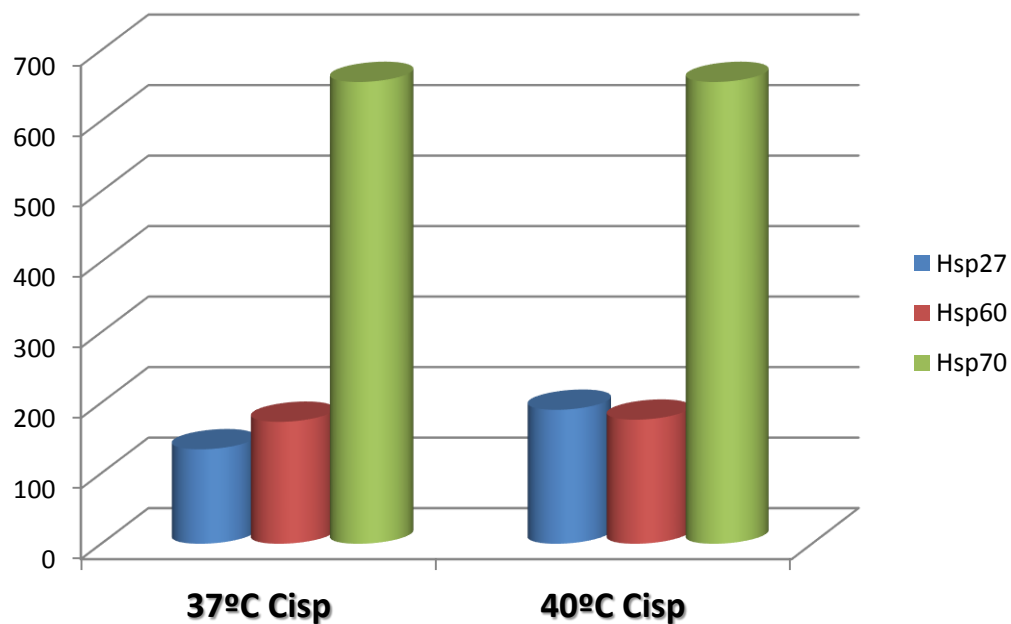


Figura 7.- Variación en la expresión de proteínas de la familia Hsp de 37°+Cisplatino a 40° C+Cisplatino

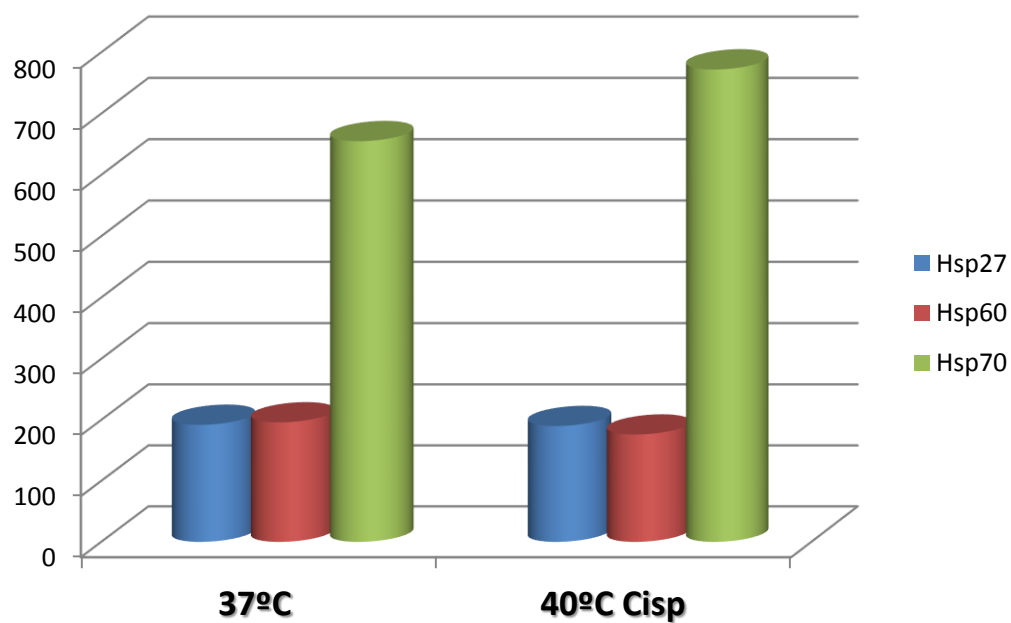


Figura 8.- Variación en la expresión de proteínas de la familia Hsp de 37° C a 40° C+Cisplatino

3.3.- Otras proteínas relacionadas con la apoptosis

Además de las proteínas de la familia Bcl-2 y Hsp, se determinó la expresión de otras proteínas implicadas en el proceso de la apoptosis a diferentes niveles:

1.- Proapoptóticas: FADD, Fas/TNFR-SF6, Pro-Caspasa 3, SMAC/Diablo, Citocromo C y HTRA2/Omi.

2.- Antiapoptóticas: XIAP.

El efecto de la elevación térmica desde 37°C a 40°C, ocasionó un descenso generalizado en la expresión de las proteínas con acción proapoptótica: FADD (-1,5%), Fas/TNFR-SF6 (-13,5%), Pro-Caspasa 3 (-20,4%), SMAC/Diablo (-17,4%), Citocromo C (-58,3%) y HTRA2/Omi (-29,1%). En el caso de la proteína inhibidora de la apoptosis XIAP, se evidenció un incremento en su expresión (+20,4%).

La determinación de la expresión proteica de las muestras a 37°C y 37°C con adicción de cisplatino, mostró descenso porcentual (por la acción del citostático), en la expresión de las proteínas proapoptóticas FADD (-28,2%) y Fas/TNFR-SF6 (-40,9%), mientras que el resto de proteínas analizadas incrementaron su expresión: Pro-Caspasa 3 (+61,5%), SMAC/Diablo (+96,5%), Citocromo C (+2,2%), HTRA2/Omi (+36,6%) y XIAP (+128,8%).

La comparación de las muestras a 37°C+cisplatino y 40°C+cisplatino, evidenció un incremento de FADD (+205,2%), Pro-Caspasa 3 (+30,8%), SMAC/Diablo (+8,21%) y HTRA2/Omi (+4,1%), decremento de XIAP (-20,6%), descenso muy leve de Citocromo C (-0,6%) y ausencia de cambios para Fas/TNFR-SF6.

El análisis de las tasas de la expresión proteica a 37°C (basal) y a 40°C+cisplatino, evidenció descenso únicamente en Fas/TNFR-SF6 (-40,9%) e incremento en el resto de las proteínas: FADD (+119,7%), Pro-Caspasa 3 (+111,3%), SMAC/Diablo (+112,6%), XIAP (+106%), Citocromo C (+1,64%) y HTRA2/Omi (+42,1%).

El compendio de los resultados de las variaciones de estas proteínas quedan expresados en la Tablas F y G y en las Figuras 9 a 12.

RESULTADOS

PROTEINA	37°C	40°C	37°C+Cisp	40°C+Cisp
<i>PRO-APOPTÓTICAS:</i>				
FADD	213	210	153	468
FAS/TNFR-SF6	978	846	578	578
Pro-Caspasa 3	2562	2041	4139	5415
SMAC/Diablo	799	660	1570	1699
Citocromo C	1700	711	1738	1728
HTRA2/Omi	486	345	664	691
<i>ANTI-APOPTÓTICAS:</i>				
XIAP	288	347	659	596

Tabla F.- Concentración de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico.

RESULTADOS

PROTEINA	% variación 37°C/40°C	% variación 37°C/37°C+Cisp	% variación 37°C+Cisp/40°C+Cisp	% variación 37°C/40°C+Cisp
PRO-APOPTÓTICAS:				
FADD	-1,5%	-28,2%	+205,2%	+119,7%
FAST/TNFR-SF6	-13,5%	-40,9%	0%	-40,9%
Pro- Caspasa 3	-20,4%	+61,5%	+30,8%	+111,3%
SMAC/Diablo	-17,4%	+96,5%	+8,2%	+112,6%
Citocromo C	-58,3%	+2,2%	-0,6%	+1,6%
HTRA2/Omi	-29,1%	+36,6%	+4,1%	+42,1%
ANTI-APOPTÓTICAS:				
XIAP	+20,4%	+128,8%	-20,6%	+106%

Tabla G.- Variaciones porcentuales en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico

RESULTADOS

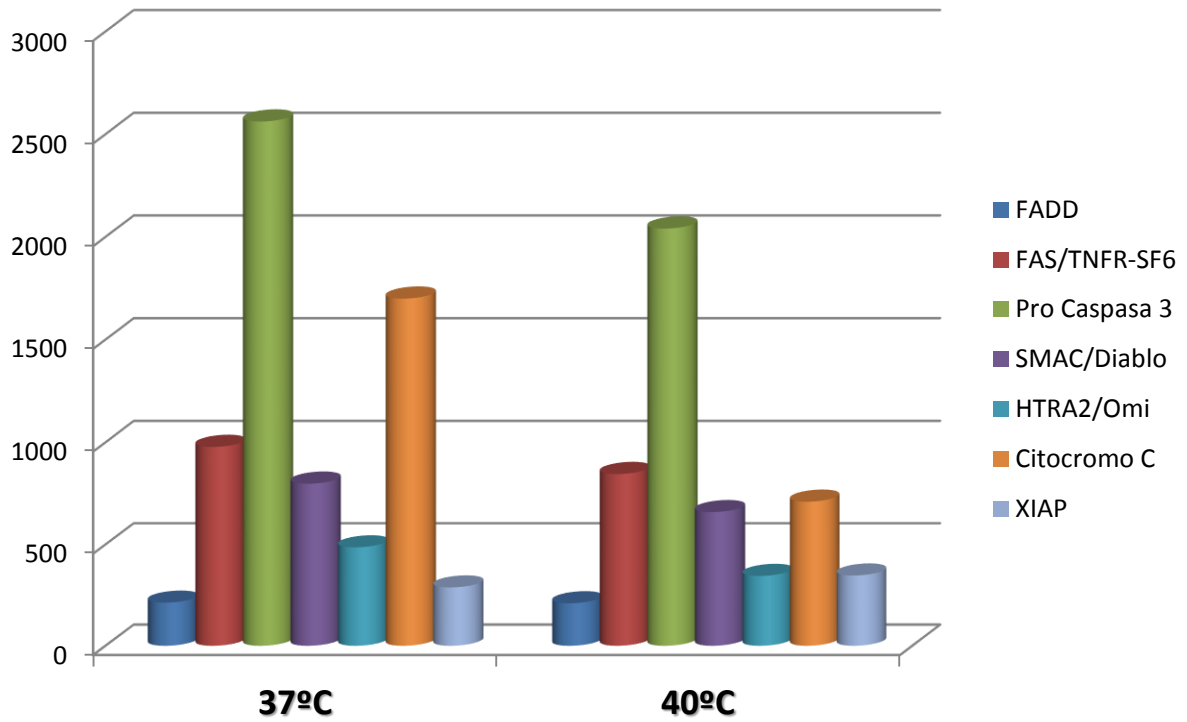


Figura 9.- Variación en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico de 37°C a 40°C

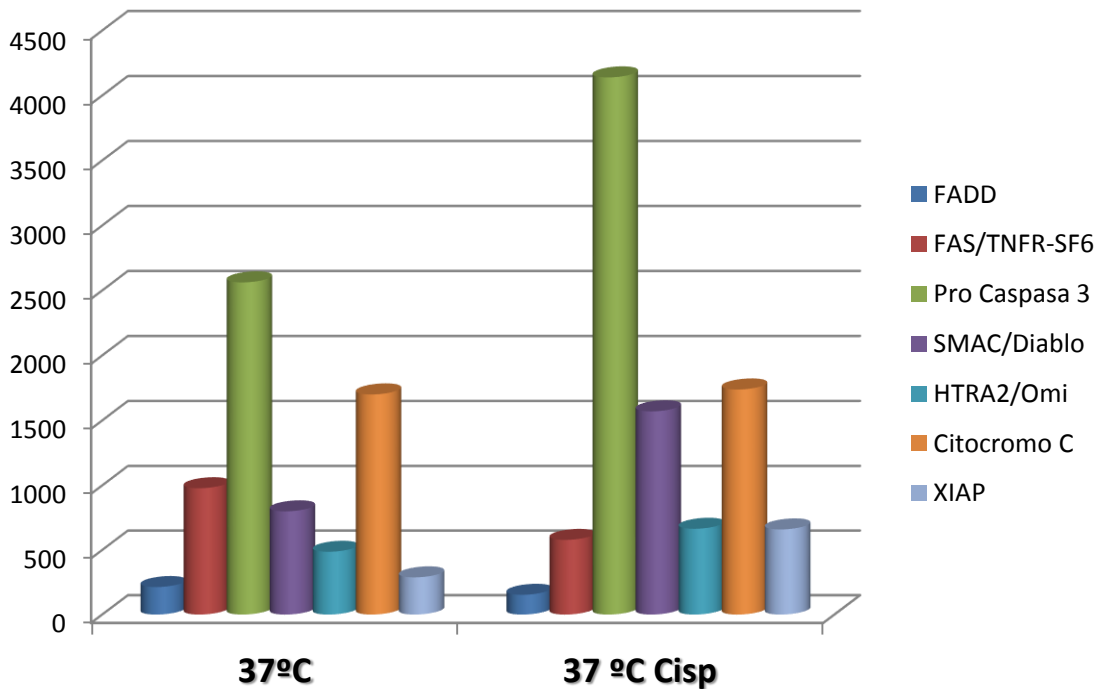


Figura 10.- Variación en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico de 37°C a 37°C+Cisplatino

RESULTADOS

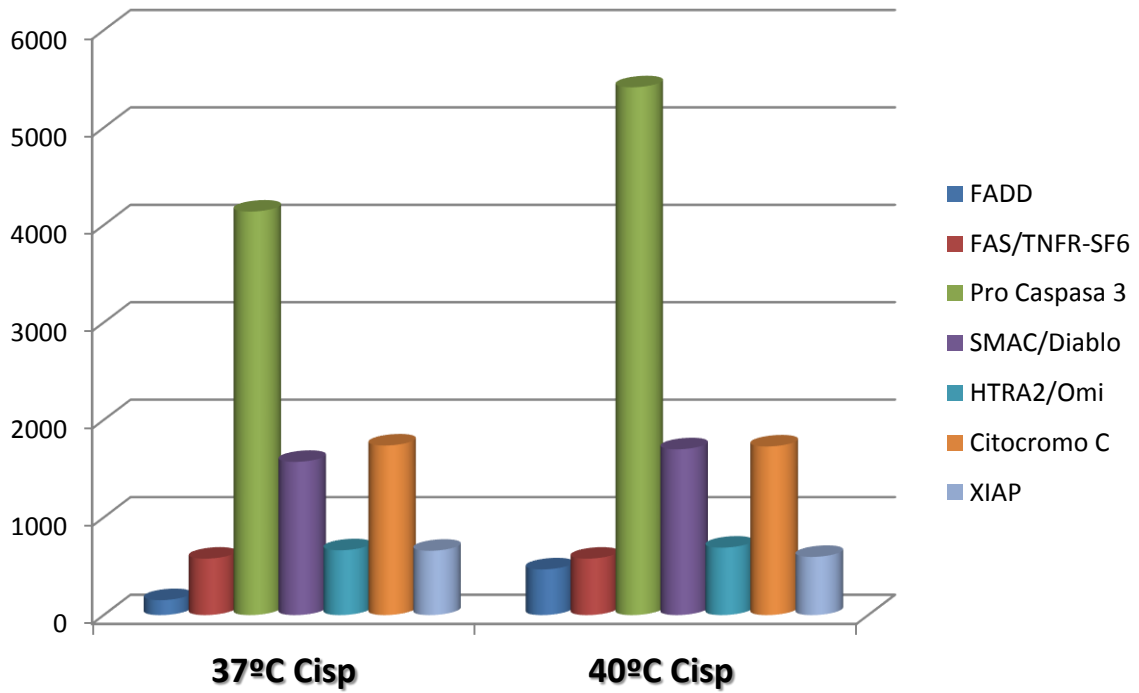


Figura 11.- Variación en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico de 37°C+Cisplatino a 40°C+Cisplatino

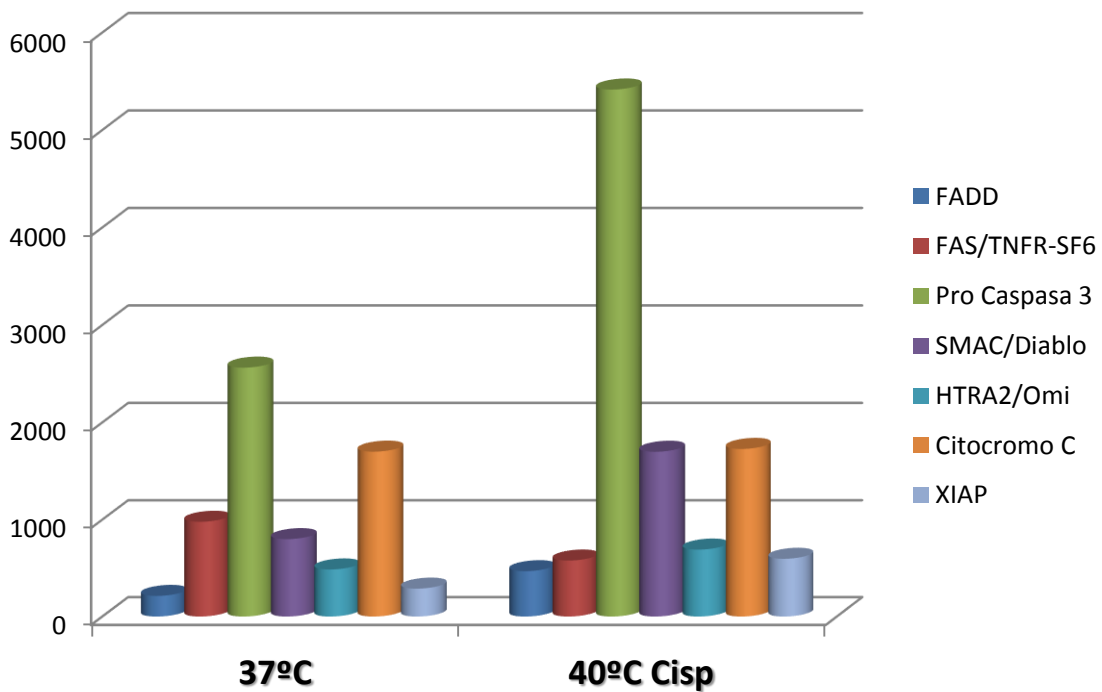


Figura 12.- Variación en la expresión de proteínas relacionadas con el proceso apoptótico de 37°C a 40°C+Cisplatino

3.4.- Compendio de la variación en conjunto de las proteínas con acción proapoptótica

Si expresamos de forma conjunta los hallazgos observados, refiriéndonos a las proteínas con acción proapoptótica, los resultados fueron los siguientes:

El efecto de la temperatura de manera aislada (variación de 37°C a 40°C), asoció un descenso generalizado en la expresión de todas las proteínas proapoptóticas.

El efecto aislado del citostático (comparación de muestras 37°C y 37°C+cisplatino), se vio seguido de un comportamiento heterogéneo, con descenso de Bad, Bax, FADD y FAS/TNFR-SF6 e incremento de Citocromo C, Pro-Caspasa 3, Smac/Diablo y HTRA2/Omi.

En la comparación de muestras a 37°C+cisplatino y 40°C+cisplatino, pudo apreciarse elevación generalizada en la expresión de todas las proteínas proapoptóticas determinadas, a excepción de Citocromo C que presentó un levísimo descenso y FAS/TNFR-SF6 que no sufrió modificaciones.

La respuesta al efecto combinado del incremento de temperatura y cisplatino desde la situación basal (variación de 37°C a 40°C+cisplatino), resultó en un incremento generalizado de todas las proteínas proapoptóticas, a excepción de Fas/TNFR que presentó disminución en su expresión.

El compendio de los resultados referidos a las proteínas con acción proapoptótica quedan expresados en las Tablas H e I y en las Figuras 13 a 16.

RESULTADOS

PROTEINA	37°C	40°C	37°C+Cisp	40°C+Cisp
Bad	174	149	156	474
Bax	239	238	223	788
Citocromo C	1700	711	1738	1728
Pro Caspasa 3	2562	2041	4139	5415
FADD	213	210	153	468
FAS/TNFR-SF6	978	846	578	578
SMAC/Diablo	799	660	1570	1699
HTRA2/Omi	486	345	664	691

Tabla H.- Concentración de proteínas con acción proapoptótica

PROTEINA	% variación 37°C/40°C	% variación 37°C/37°C+Cisp	% variación 37°C+Cisp/40°C+Cisp	% variación 37°C/40°C+Cisp
Bad	-14,3%	-11%	+203%	+172,4%
Bax	-0,45%	-6,7%	+253%	+229,7%
Citocromo C	-58,3%	+2,2%	-0,6%	+1,6%
Pro Caspasa 3	-20,4%	+61,5%	+30,8%	+111,3%
FADD	-1,5%	-28,2%	+205,2%	+119,7%
FAS/TNFR-SF6	-13,5%	-40,9%	0%	-40,9%
SMAC/Diablo	-17,4%	+96,5%	+8,2%	+112,6%
HTRA2/Omi	-29,1%	+36,6%	+4,1%	+42,1%

Tabla I.- Variaciones en la expresión de proteínas con acción proapoptótica

RESULTADOS

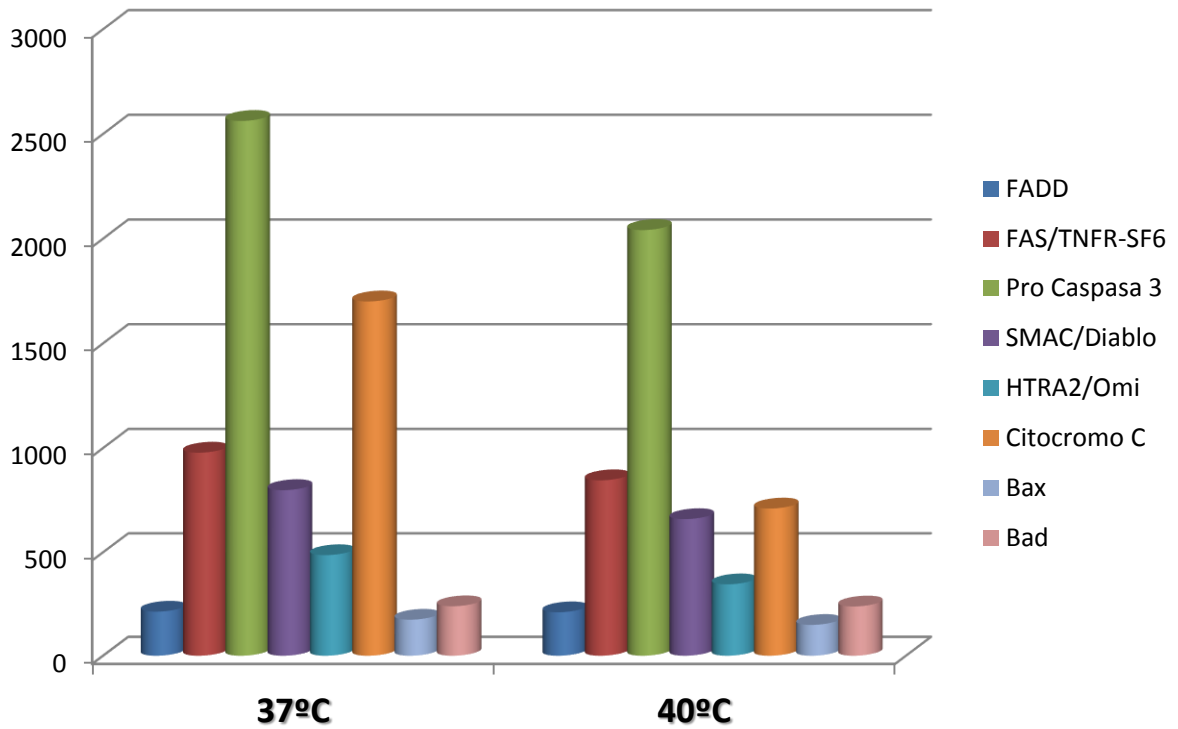


Figura 13.- Variación en la expresión de proteínas con acción proapoptótica de 37°C a 40°C

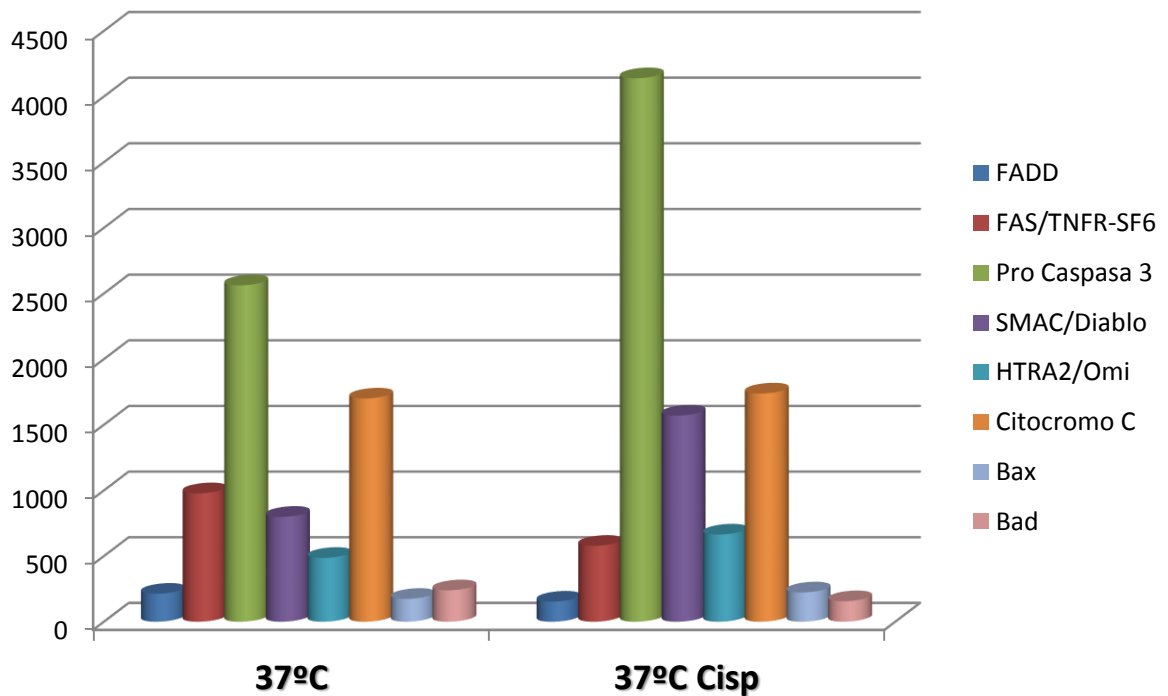


Figura 14.- Variación en la expresión de proteínas con acción proapoptótica de 37°C a 37°C+Cisplatino

RESULTADOS

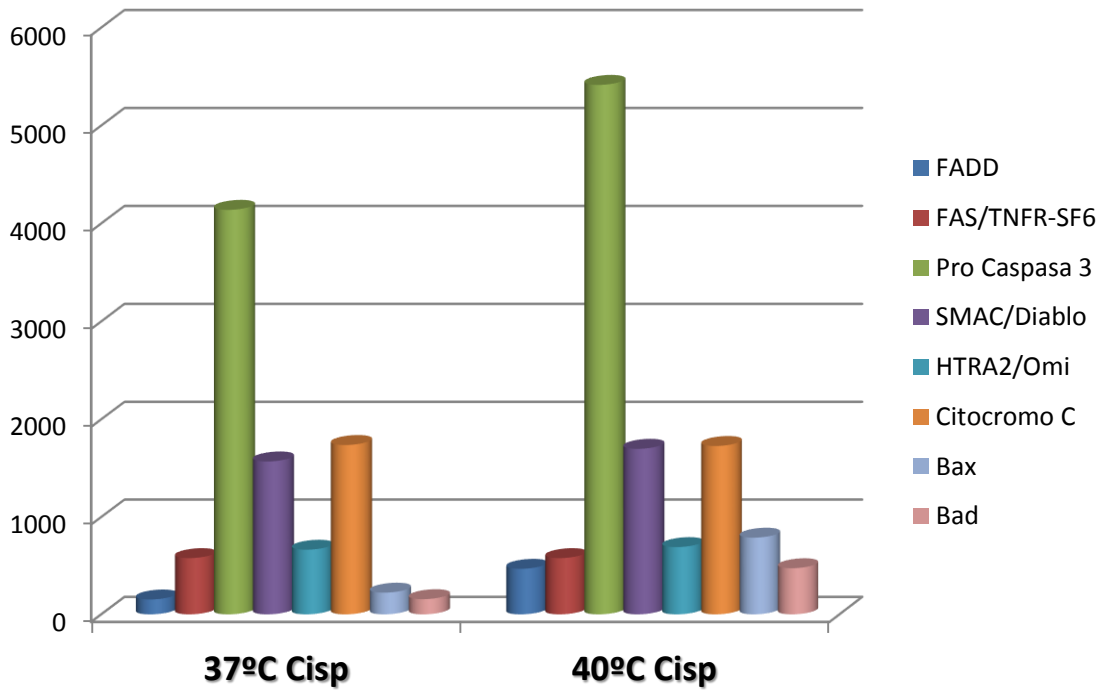


Figura 15.- Variación en la expresión de proteínas con acción proapoptótica de 37°C+Cisplatino a 40°C+Cisplatino

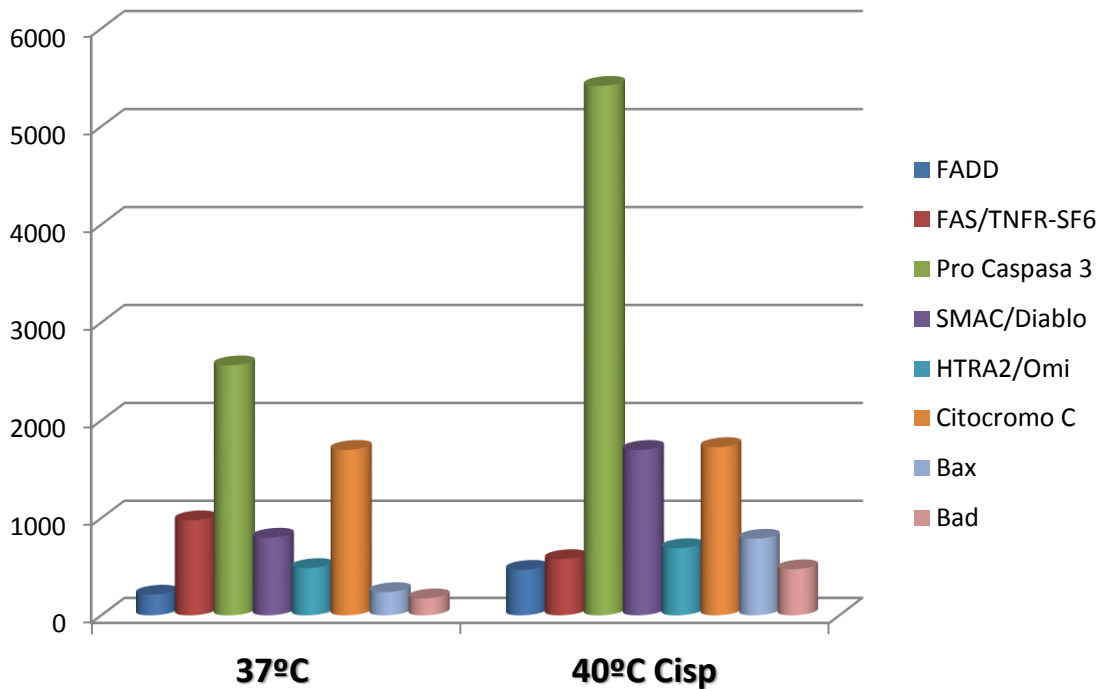


Figura 16.- Variación en la expresión de proteínas con acción proapoptótica de 37°C a 40°C+Cisplatino

3.5.- Compendio de la variación en conjunto de las proteínas con acción antiapoptótica

Si expresamos de forma conjunta los hallazgos observados refiriéndonos a las proteínas con acción antiapoptótica, los resultados fueron los siguientes:

El efecto de la temperatura de manera aislada (variación de 37°C a 40°C), asoció descenso de Bcl-2, Hsp70 y Hsp27 e incremento de XIAP, Bcl-x y Hsp60.

El efecto aislado del citostático (comparación de muestras 37°C y 37°C+cisplatino), se vio seguido de un comportamiento heterogéneo, con descenso de Bcl-x, Bcl-2, Hsp27 y Hsp60 e incremento de XIAP y Hsp70.

En la comparación de muestras a 37°C+cisplatino y 40°C+cisplatino, pudo apreciarse elevación en la expresión de todas las proteínas con acción antiapoptótica analizadas, a excepción de XIAP que mostró decremento.

La respuesta al efecto combinado del incremento de temperatura y cisplatino desde la situación basal (variación de 37°C a 40°C+cisplatino), resultó en un incremento de la expresión de XIAP, Bcl-2, Bcl-x y Hsp70 y leve descenso de Hsp27 y Hsp60.

El compendio de los resultados referidos a las proteínas con acción proapoptótica quedan expresados en las Tablas J y K y en las Figuras 17 a 20.

RESULTADOS

PROTEINA	37°C	40°C	37°C+Cisp	40°C+Cisp
Bcl-2	286	251	199	656
Bcl-x	147	171	101	468
XIAP	288	347	659	596
Hsp 27	192	182	134	190
Hsp 60	196	257	173	176
Hsp 70	345	328	655	772

Tabla J.- Concentración de proteínas con acción antiapoptótica

PROTEINA	% variación 37°C/40°C	% variación 37°C/37°C+Cisp	% variación 37°C+Cisp/40°C+Cisp	% variación 37°C/40°C+Cisp
Bcl-2	-12,2%	-30,5%	+229%	+172,4%
Bcl-x	+16,3%	-31,3%	+363,3%	+229,7%
XIAP	+20,4%	+128,8%	-20,6%	+106%
Hsp 27	-5,2%	-30,3%	+41,8%	-1,1%
Hsp 60	+31,1%	-11,8%	+1,8%	-10,2%
Hsp 70	-4,9%	+89,8%	+17,8%	+223,7%

Tabla K.- Variaciones en la expresión de proteínas con acción antiapoptótica

RESULTADOS

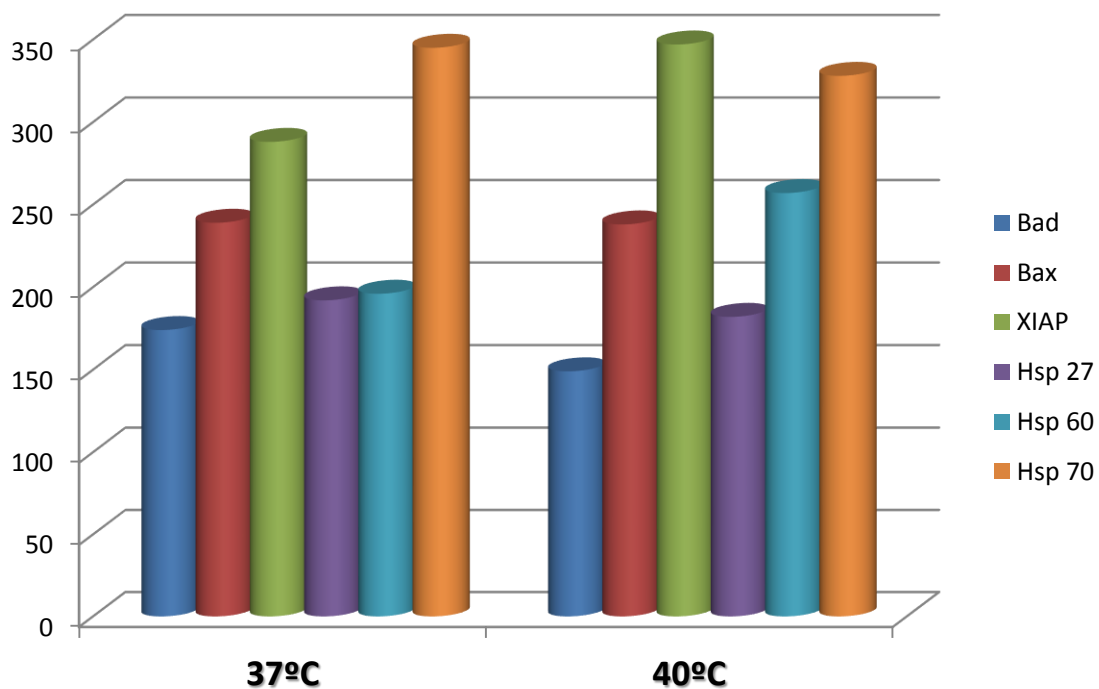


Figura 17.- Variación en la expresión de proteínas con acción antiapoptótica de 37°C a 40°C

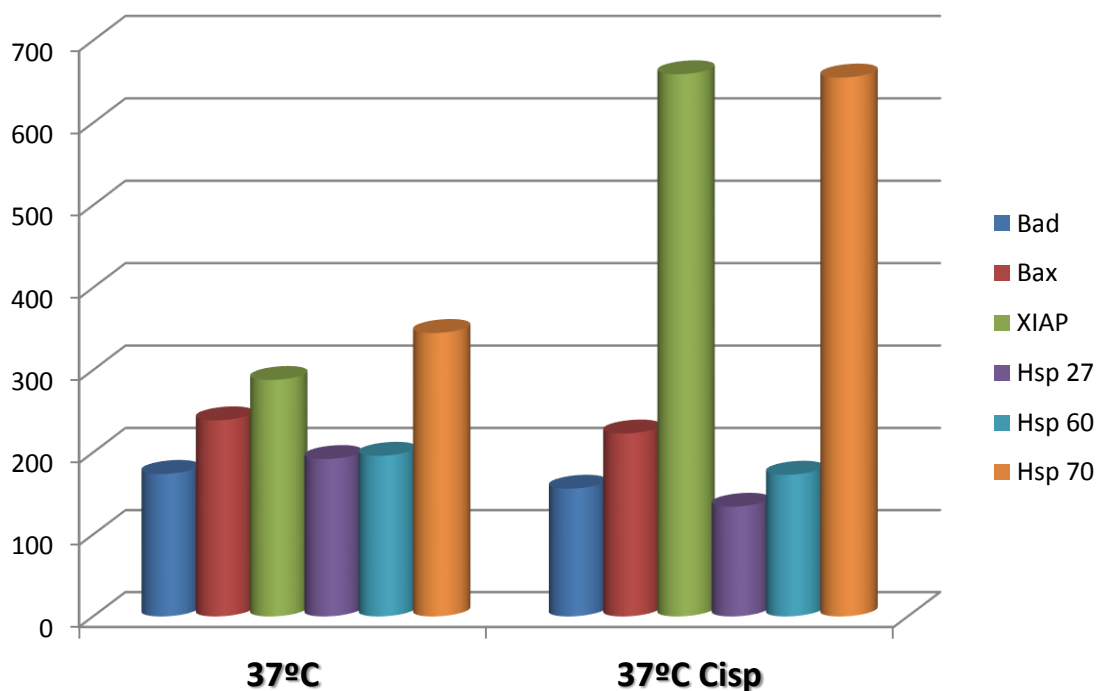


Figura 18.- Variación en la expresión de proteínas con acción antiapoptótica de 37°C a 37°C+Cisplatino

RESULTADOS

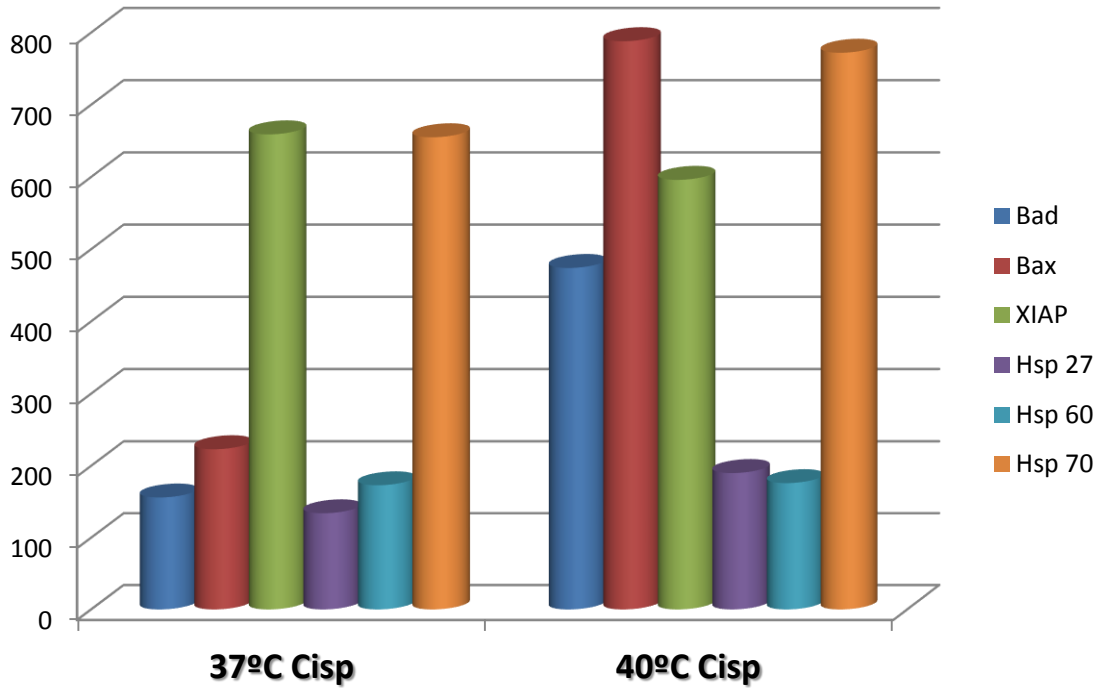


Figura 19.- Variación en la expresión de proteínas con acción antiapoptótica de 37°C+Cisplatino a 40°C+Cisplatino

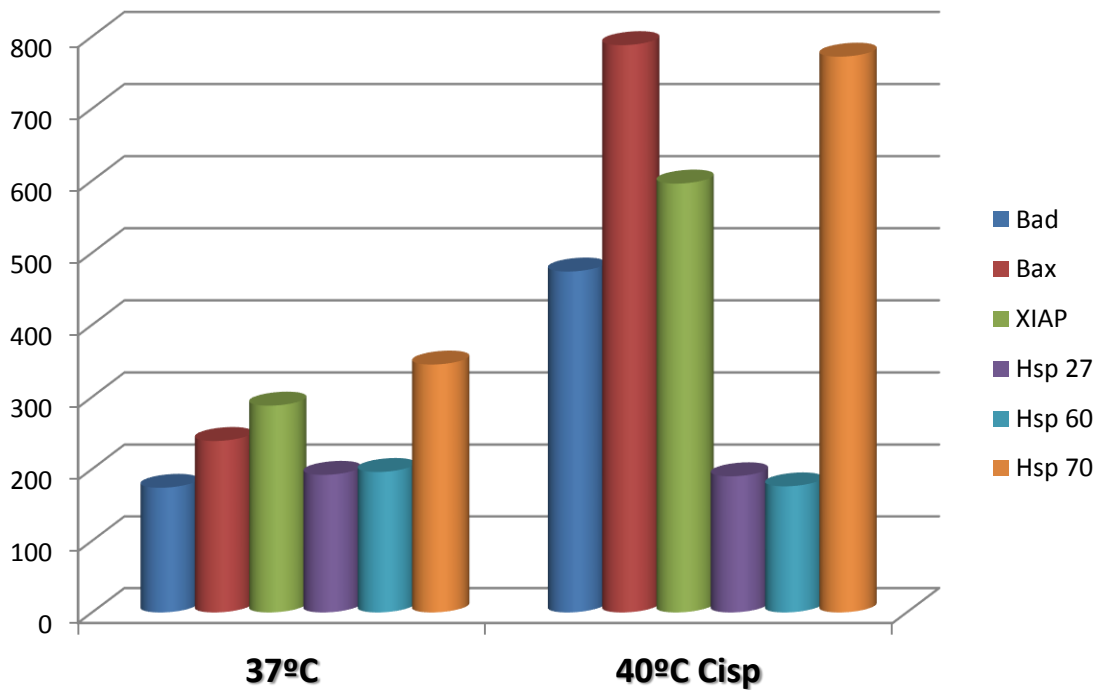


Figura 20.- Variación en la expresión de proteínas con acción antiapoptótica de 37°C a 40°C+Cisplatino

3.6.- Compendio de la variación en conjunto de las proteínas con acción proapoptótica y antiapoptótica en relación con el tipo histológico tumoral

Al analizar la variación en la expresión proteica de las muestras teniendo en cuenta el tipo histológico, se pudieron apreciar los siguientes resultados:

3.6.1.- Adenocarcinoma poco diferenciado

De manera general pudo apreciarse un descenso en la expresión de proteínas tanto proapoptóticas como antiapoptóticas para todas las condiciones ensayadas: efecto aislado de la temperatura, efecto aislado del cisplatino y efecto combinado de la hipertermia y el citostático. Se constató elevación en Bad y Bax en relación al efecto del citostático aislado y del incremento térmico asociado al cisplatino. También mostraron incremento, aunque sólo para algunas condiciones, FADD, Bcl-2, HTRA2/Omi y las proteínas de la familia Hsp.

3.6.2.- Adenocarcinoma bien diferenciado

En este caso se apreció la respuesta casi contraria, objetivándose un incremento generalizado (a excepción de Pro-Caspasa 3), de todas las proteínas cuantificadas y para todas las condiciones ensayadas. Así mismo, las antiapoptóticas Hsp27 y XIAP presentaron decremento tras la acción conjunta de la hipertermia y el cisplatino.

3.6.3.- Mesotelioma

En el caso del mesotelioma se observó una elevación generalizada de las proteínas proapoptóticas para todas las condiciones, a excepción de Citocromo C y de Fas/TNFR-SF6. En el caso de las proteínas con acción antiapoptótica, pudo apreciarse descenso en Bcl-x y ascenso de Hsp70, Hsp60 y XIAP para todas las condiciones ensayadas.

El compendio de los resultados de las variaciones de expresión proteica en función del subtipo histológico, quedan expresados en las Tablas L, M y N.

Proteína	% variación 37°C – 40°C	% variación 37°C – 37°C + cisp	% variación 37°C – 40°C + cisp
Bad	0%	+22,1%	+15%
Bax	-27,6%	+16%	+14,4%
Bcl-2	-8,4%	-5%	+0,7%
FADD	+18%	-4%	+32%
Bcl-x	-8,2%	-60%	-10%
Fas/TNFR SF6	-2%	-7,3%	-5,1%
Pro-Caspasa 3	-9,2%	-20,1%	-15,5%
HSP27	-7,3%	-30%	+4%
Smac/Diablo	-3,9%	-8,4%	-13,8%
HSP60	-39,6%	+37,5%	-47%
HSP70	+4,3%	-2%	-2,3%
HTRA2/Omi	+21,3%	-12%	-23%
XIAP	-16,6%	-12%	-28,2%
Citocromo C	-12,4%	-10,8%	-17,5%

Tabla L.- Variaciones en la expresión proteica en adenocarcinomas poco diferenciados.

<i>Proteína</i>	% variación 37°C – 40°C	% variación 37°C – 37°C + cisp	% variación 37°C – 40°C + cisp
Bad	+24,7%	+18%	+46,2%
Bax	+69,4%	+47%	+98%
Bcl-2	+33%	+20,3%	+13,8%
FADD	+43,1%	+37,8%	+45,4%
Bcl-x	+53,1%	+57,2%	+53,7%
Fas/TNFR SF6	+32,8%	+12,4%	+26,9%
Pro-Caspasa 3	-7,3%	-17,1%	-8%
HSP27	+31,2%	+12,1%	-82,5%
Smac/Diablo	+3,8%	+6,9%	+1,1%
HSP60	+105,7%	+65,4%	+75,3%
HSP70	+22,8%	+8,5%	+24,2%
HTRA2/Omi	+3,5%	+1,9%	+15%
XIAP	+4,5%	+12,6%	-26,5%
Citocromo C	-3,9%	+6,2%	0%

Tabla M.- Variaciones en la expresión proteica en adenocarcinomas bien diferenciados.

RESULTADOS

<i>Proteína</i>	% variación 37°C – 40°C	% variación 37°C – 37°C + cisp	% variación 37°C – 40°C + cisp
Bad	-24,7%	+15%	-17,6%
Bax	+122,4%	+206,7%	+220,2%
Bcl-2	+15,7%	-14,7%	+32,6%
FADD	+15,7%	+5,6%	+13,5%
Bcl-x	-16%	-36,3%	-16,7%
Fas/TNFR-SF6	-3,1%	-50,4%	-73%
Pro-Caspasa 3	+17,2%	+6,6%	+24,6%
HSP27	+15,5%	-21,1%	+2,7%
Smac/Diablo	+5,1%	-37,1%	-53,2%
HSP60	+47,4%	+36%	+30,9%
HSP70	+253%	+124,7%	+170%
HTRA2/Omi	+3,1%	-1,5%	+34,8%
XIAP	+29,7%	+104%	+44,5%
Citocromo C	-15,9%	-7,9%	-22%

Tabla N.- Variaciones en la expresión proteica en mesotelioma pleural maligno.

Discusión

1.- ¿Está justificada la investigación de la quimioterapia hipertérmica intrapleural? ¿Es necesario proseguir en la investigación de la misma?

El mesotelioma pleural maligno es un tumor agresivo que presenta un mal pronóstico y cuya incidencia se ha incrementado en los países industrializados. Los datos epidemiológicos de los que se dispone estiman un aumento de su incidencia y de la mortalidad asociada al mismo durante la próxima década. Las terapias con quimioterapia y radioterapia, acompañadas o no de la exéresis quirúrgica, no logran ofrecer en la actualidad un control satisfactorio de la enfermedad. Por otra parte, la infiltración tumoral maligna metastásica de la pleura se asocia igualmente a tasas de supervivencia de pocos meses y gran afectación de la calidad de vida de los enfermos afectados^{4,55}.

En los últimos años la aplicación de quimioterapia hipertérmica a nivel intrapleural ha sido realizada de forma experimental en diferentes unidades de cirugía torácica de distintos hospitales de Japón, Estados Unidos y Europa. Algunos grupos como los de Sugarbaker, Yellin e Isik^{56,57,58} han obtenido recientemente resultados prometedores en lo referente al incremento del tiempo libre de enfermedad y a la supervivencia global, en pacientes seleccionados, tras la aplicación de este tipo de tratamiento.

Sin embargo no se han aclarado por completo los mecanismos biomoleculares implicados en la lesión celular secundaria a la aplicación combinada de hipertermia y citostáticos. Por otro lado, no ha sido posible establecer aún protocolos definitivos de administración, ya que existen numerosas incógnitas por resolver que permitan optimizar y normalizar este tipo de terapia.

Factores como el tipo de citostático y dosis a emplear, la temperatura idónea de aplicación y el tiempo de exposición a estos agentes, deben ser consensuados y establecidos, a fin de protocolizar guías clínicas al respecto y conseguir establecer la indicación adecuada y segura de este tipo de tratamiento ^{4,26,58,59}.

Por todo ello se hace necesario proseguir la investigación en este campo, intentando obtener resultados que permitan dar respuesta a las preguntas reseñadas y ofrecer a los enfermos, con mayor garantía, un tratamiento que mejore su pronóstico vital y les aporte calidad de vida.

2.- ¿Es posible afirmar que la quimioterapia hipertérmica induce apoptosis en las células neoplásicas? ¿Podría por tanto considerarse que dicha terapia tiene el efecto esperado?

La respuesta de las células neoplásicas a diferentes agentes, en términos de apoptosis, constituye en la actualidad un tema de debate, no pudiendo establecerse de manera definitiva los mecanismos de comportamiento de dichas células tras ser sometidas a diversos tratamientos.

Actualmente se considera que existe una acción sinérgica y de potenciación de la hipertermia y los citostáticos, de manera que el incremento térmico aumentaría la profundidad de penetración del fármaco en la célula, aumentando así su efecto citotóxico.

Matsuzaki^{32,34} estudió la inducción de apoptosis en células pleurales presentes en derrames pleurales neoplásicos, mediante la aplicación de quimioterapia hipertérmica. Sus resultados, citados en la introducción de este trabajo, le permitieron concluir en un aumento significativo del porcentaje de apoptosis celular tras el efecto combinado sobre las células pleurales del citostático (cisplatino) y el incremento de la temperatura.

En nuestro estudio, tras efectuar la señalización celular encaminada a la diferenciación de las células neoplásicas de las no tumorales (granulocitos, macrófagos...etc), se procedió a cuantificar en las muestras de líquido pleural el porcentaje de células inflamatorias y neoplásicas en apoptosis.

En principio, tanto la respuesta de las células no tumorales como la de las células neoplásicas al efecto sinérgico de la hipertermia y el citostático, se tradujo en un aumento significativo del porcentaje de células en apoptosis. Basándonos en estos resultados podríamos afirmar que el efecto observado en nuestra experiencia, estaría en concordancia con los resultados de los estudios de Matsuzaki.

Si consideramos nuestros resultados, en lo que se refiere al estudio de las proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis celular, pudimos constatar que el efecto combinado del incremento de temperatura y el cisplatino se vio seguido de variaciones ostensibles en la expresión porcentual de las principales proteínas implicadas en el mismo.

En efecto, en nuestra experiencia se observó un incremento generalizado en la expresión de las proteínas con efecto proapoptótico. También pudo apreciarse elevación de algunas de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (Bcl-2, Bcl-x, XIAP, Hsp70) y disminución de otras (Hsp27 y Hsp60).

La acción de algunas proteínas proapoptóticas (como Smac/Diablo y HTRA2/Omi) consiste en bloquear a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) como XIAP. Del mismo modo algunas de las proteínas antiapoptóticas bloquean a otras con efecto proapoptótico (por ejemplo XIAP bloquea la acción de las caspasas). De esta manera, el proceso de la apoptosis comprende un complejo equilibrio en el que la expresión de diversas proteínas que se bloquean y activan entre sí, resulta finalmente en la degradación y eliminación de la célula. Por otra parte las proteínas de la familia Hsp con función citoprotectora o estabilizadora, presentan un efecto inicial antiapoptótico que desaparece cuando el estímulo lesivo se mantiene en el tiempo, de forma que tras verse sobrepasadas no son capaces de evitar la apoptosis.

La elevación observada en nuestra experiencia de las proteínas con efecto antiapoptótico y/o citoprotector tras el efecto de la quimioterapia hipertérmica, estaría muy probablemente en relación con la respuesta de las células a la agresión, en un intento inicial de defensa y conservación de las mismas, que finalmente se vería superado por la acción de las proteínas con acción proapoptótica. Dado que la acción conjunta de la hipertermia y el cisplatino se vio seguida de un significativo aumento en el porcentaje de células en apoptosis, podemos concluir que el balance final entre el aumento de las proteínas favorecedoras y/o efectoras de la apoptosis y el de algunas de las antiapoptóticas o citoprotectoras, resulta en la inducción efectiva de apoptosis celular.

Existen pocas publicaciones que analicen la expresión de proteínas a nivel celular relacionadas con la apoptosis tras el efecto de agentes citostáticos e hipertermia. En este sentido podemos citar el estudio publicado por Zhao en 2015⁶⁰ analizando la respuesta de células de adenocarcinoma pulmonar al efecto combinado del agente con efecto antitumoral de origen vegetal Paris Saponin I e hipertermia de 43°C. Zhao apreció elevación de Bax y Caspasa 3, con descenso de Bcl-2, resultados que son concordantes parcialmente con los de nuestro estudio (elevación de Bax y Pro-Caspasa 3, no así descenso de Bcl-2). Esta discordancia parcial de resultados, podría deberse a la distinta temperatura y agente antineoplásico empleados por Zhao, así como al tipo de células empleadas en su estudio.

Los resultados obtenidos en nuestra experiencia, ponen de manifiesto los notables cambios inducidos en las células neoplásicas, en lo que a la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis se refiere, tras el efecto combinado de la hipertermia y agentes citotóxicos. Así mismo, el incremento en el porcentaje de apoptosis en las células tumorales tras ser sometidas a quimioterapia hipertérmica queda patentemente demostrado, por lo que podemos afirmar que esta combinación terapéutica, al menos a nivel celular *in vitro*, se sigue del efecto esperado y deseado.

3.- ¿Es la respuesta a la hipertermia y los citostáticos igual en todas las células neoplásicas? ¿Deberían plantearse diferentes esquemas terapéuticos dependiendo del tipo de neoplasia pleural?

En nuestro estudio, al analizar la modificación en la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis en función del subtipo histológico, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto diferencias evidentes de respuesta entre los diversos tipos histológicos de las células tumorales pleurales estudiadas. En el caso de los adenocarcinomas, la modificación de la expresión proteica resultó diferente en razón del grado de diferenciación de los mismos. En los que presentaban bajo grado de diferenciación, pudo apreciarse un descenso generalizado de casi todas las proteínas estudiadas. Por el contrario, en el caso de los bien diferenciados, se pudo constatar una respuesta distinta, y casi antagónica, representada por la elevación de la práctica totalidad de las proteínas determinadas. En el caso de la afectación pleural por mesotelioma, la respuesta resultó más heterogénea con elevación y descenso en la concentración de proteínas favorecedoras del proceso apoptótico, así como para las inhibidoras del mismo.

En relación a estos resultados podemos destacar el estudio publicado por Cregan en 2013⁶¹, que pone de manifiesto la existencia de diferente sensibilidad célula-dependiente y droga-dependiente en lo que a la respuesta apoptótica de las células neoplásicas se refiere. En dicho trabajo se investigó la respuesta de células de mesotelioma al efecto del cisplatino y el papel de algunas de las proteínas implicadas en el proceso de apoptosis, encontrándose que la inhibición de la activación de las caspasas por XIAP no tiene relevancia en la resistencia relativa del mesotelioma al tratamiento con cisplatino. Dichos resultados, evidenciarían que existen vías *caspara independientes* implicadas en la respuesta celular del mesotelioma a los citostáticos.

Este tipo de comportamiento anómalo de las células neoplásicas, en términos de inducción de apoptosis en respuesta a diversos agentes lesivos, podría ser observado muy probablemente en la mayor parte de los distintos tipos de tumores. De esta manera, podemos decir que dependiendo del tipo histológico concreto de cada neoplasia, existirían diversas vías de iniciación y ejecución de la apoptosis, que son preferenciales en unos tipos celulares y que se encuentran ausentes en otros.

Los resultados publicados en marzo de 2015 por Zanardelli⁶², apoyan igualmente dicha teoría. Al comparar la respuesta, en términos de inducción de apoptosis, a la acción del oxaliplatino de astrocitos sanos y de células neoplásicas de carcinoma de colon, pudo apreciar que ambos tipos celulares presentaban vías específicas y diferentes de activación de la apoptosis. De este modo, en el caso de las células nerviosas sanas, apreció inducción de la vía mitocondrial con elevada liberación de Citocromo C, descenso de Bcl-2 y ausencia de cambios en la expresión de Caspasa-8. Por el contrario, en el caso de las células tumorales intestinales, objetivó elevación significativa de la Caspasa-8 y activación de la vía apoptótica extrínseca. Adicionalmente, los estudios de Matsuzaki^{32,34} reflejan diferente respuesta, en términos de apoptosis, para diferentes tipos celulares (adenocarcinoma pulmonar y mesotelioma).

Las diferentes respuestas de las células según el tipo histológico obtenidas en nuestro estudio, pueden explicarse por el fenómeno apuntado en los trabajos referidos y constituyen un dato más que apoyaría la existencia de vías alternativas y diferentes en la ejecución de la apoptosis para las distintas células neoplásicas, que varían entre los diversos tipos histológicos. En nuestra experiencia, podemos resaltar la elevación únicamente de las proteínas con acción proapoptótica de la familia Bcl-2 (Bad y Bax) en el caso de los adenocarcinomas poco diferenciados y el decremento casi exclusivo de Pro-Caspasa 3 en los adenocarcinomas bien diferenciados. Dichos resultados se verían relacionados, muy probablemente, con determinada afinidad hacia una vía concreta de ejecución del proceso apoptótico en cada tipo histológico.

Teniendo en cuenta lo expuesto, parece evidente que la investigación de las vías que regulan la apoptosis en los distintos tipos de células tumorales en función de su histología concreta, resulta crucial para poder establecer nuevas dianas terapéuticas y en consecuencia desarrollar terapias más efectivas y personalizadas en el control de las enfermedades neoplásicas, tanto a nivel pleural como sistémico. Podríamos decir que debería valorarse el empleo de distintos esquemas de aplicación de la quimioterapia hipertérmica en cada caso concreto, en función del tipo histológico de la neoplasia a tratar.

En este sentido no se dispone en la actualidad de datos suficientes que permitan establecer terapias dirigidas o individualizadas, por lo que consideramos imprescindible proseguir la investigación en este campo.

4.- ¿La hipertermia aislada es capaz de inducir apoptosis efectiva en las células tumorales? Si así fuera, ¿podría considerarse su establecimiento como terapia aislada?

Los resultados publicados por Kimura en el año 2010³⁶, concluyen en que la hipertermia como terapia aislada podría resultar efectiva en el tratamiento de la enfermedad pleural neoplásica. En el mismo sentido, Ba publica en 2013⁶³ un estudio en el que compara el efecto de la aplicación aislada de agua destilada a 48°C y el de la infusión de solución salina a 45°C con cisplatino en pacientes con afectación pleural metastásica. Tras analizar la aparición de complicaciones, la supervivencia y tasa de recidiva del derrame, concluye que ambas terapias pueden aplicarse con seguridad y que no presentan diferencias significativas en sus resultados.

Por contra Chen³⁷ al comparar el efecto de la hipertermia aislada y el de la quimioterapia hipertérmica, encuentra que la asociación del incremento térmico y el citostático resulta más eficaz que la aplicación de la hipertermia aislada.

Falcieri⁶⁴ al estudiar el rol de la hipertermia como activador del proceso apoptótico en cuatro líneas celulares de neoplasias hematológicas humanas, objetivó que la respuesta al calor en las diversas líneas de células era muy diferente, encontrando una importante susceptibilidad a la exposición térmica en las líneas celulares HL60 (leucemia promielocítica) y U937 (leucemia monoblástica), una escasa sensibilidad en la DOHH2 (linfoma de células B) y resistencia a la hipertermia en la K562 (línea eritroblástica de leucemia mieloide crónica). Dicha respuesta podría estar relacionada con la diferente expresión en cada tipo celular de los genes de Bcl-2 y bcr-abl, lo cual podría conferir a algunas líneas celulares tumorales una condición antiapoptótica.

Resultados similares se describen en el estudio de Harmon⁶⁵, en el que tras la exposición durante 30 minutos a 43°C de diversos tipos de células neoplásicas, se apreció una gran variabilidad de respuestas. Unas líneas celulares mostraron resistencia a la hipertermia (las células correspondientes al melanoma presentaron menos de un 1% de apoptosis) y otras escasa resistencia a la agresión térmica (las células correspondientes al linfoma de Burkitt presentaron un porcentaje de apoptosis superior al 97%).

Así mismo, el estudio de Cameron y Hou⁴², concluye la existencia de cierto grado de termorresistencia en las células del mesotelioma, así como una mayor reducción en la viabilidad celular debida al efecto del citostático y no de la hipertermia aislada.

En nuestro estudio al analizar el efecto aislado de la hipertermia, se observó en las muestras estudiadas un diferente comportamiento en la inducción de apoptosis entre las células de procesos inflamatorios y las neoplásicas. Cuando se estudió la respuesta de las células neoplásicas pudo apreciarse un aumento en el porcentaje de células en apoptosis en relación con el incremento térmico, aunque sin alcanzarse la significación estadística ($p=0,165$). Sin embargo, si fue observado un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de apoptosis en las células inflamatorias. En base a estos resultados podríamos afirmar que en el caso de las células inflamatorias el efecto aislado de la hipertermia es suficiente para inducir un aumento significativo en la apoptosis. Sin embargo, dicha afirmación no resultaría válida para las células neoplásicas, en las que la acción aislada de la temperatura no resulta suficiente para inducir un aumento significativo en el porcentaje de apoptosis, si no tan solo una tendencia lineal creciente en este sentido.

Al analizar de manera conjunta la respuesta de las células pleurales neoplásicas en lo que a la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis se refiere, el efecto aislado de la temperatura se acompañó de un descenso generalizado de las proteínas con efecto proapoptótico. En el caso de las proteínas con actividad citoprotectora, se constató elevación de XIAP, Bcl-x y Hsp60 y decremento de Bcl-2, Hsp70 y Hsp27. Ello apuntaría a una respuesta celular de defensa, pero sin que el estímulo lesivo resulte suficiente para la inducción de apoptosis significativa.

En el estudio de Glory⁶⁶ publicado recientemente, se constató el descenso de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL e incremento de la proapoptótica Bax, en relación a la hipertermia de 42°C a 43°C. También se apreció la activación de las caspasas 3 y 9 tras la agresión térmica. Dichos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos en nuestro caso, si bien hemos de apuntar que en el estudio de Glory la temperatura aplicada es mayor y las células empleadas son células sanas y no neoplásicas.

Ateniéndonos a los resultados en función de los diferentes tipos histológicos, en nuestro caso pudimos apreciar diferencias evidentes en la respuesta a la hipertermia entre las distintas células neoplásicas estudiadas. En el caso de los adenocarcinomas con escaso grado de diferenciación se pudo objetivar un descenso generalizado en casi todas las proteínas estudiadas, por el contrario en los adenocarcinomas bien diferenciados se pudo apreciar una elevación de la mayor parte de las proteínas analizadas. En las células del mesotelioma la respuesta resultó más heterogénea, si bien predominó la elevación en la expresión de la mayor parte de las proteínas determinadas. Estas observaciones, que apuntan a diferente resistencia o termotolerancia de las células neoplásicas al incremento térmico en función del tipo histológico, serían concordantes con los resultados de los estudios ya referidos de Falcieri, Harmon y Cameron y Hou.

En nuestra experiencia se ha podido constatar que el efecto aislado de la hipertermia no resulta suficiente para inducir niveles de apoptosis significativos en las células de origen tumoral, lo cual se ve apoyado por los resultados de la cuantificación de proteínas implicadas en el proceso apoptótico. Este comportamiento probablemente estaría en relación con una cierta resistencia de las células neoplásicas a la hipertermia, que sería variable según el tipo histológico.

Basándonos en estos hallazgos, podemos considerar que la hipertermia como terapia aislada no tendría la capacidad suficiente para inducir apoptosis efectiva en las células neoplásicas, por lo que en nuestra opinión, no debería ser contemplada como herramienta terapéutica única en el tratamiento de este tipo de patologías.

5.- ¿Son la temperatura de 40°C y el tiempo de aplicación de 2 horas adecuados? ¿Es posible establecer en este tipo de tratamiento una determinada temperatura y tiempo de exposición como los más idóneos?

Como ya ha quedado demostrado en la introducción, son múltiples los estudios publicados en la última década referidos al ensayo de la quimioterapia hipertérmica intrapleural. En todos ellos, la temperatura aplicada y el tiempo de exposición son diversos. Por destacar algunos de los más relevantes, podemos señalar que Chang y Sugarbacker³¹ al igual que Ried⁴⁰ emplean la temperatura de 42°C durante 60 minutos. Matsuzaki³⁴ utiliza 43°C durante 2 horas y Kimura³⁶ también utiliza los 43°C pero durante 30 minutos. Yu³⁹ aplicando el citostático a 44°C durante 2 horas, es el autor que utiliza el mayor incremento térmico de los publicados en la aplicación clínica.

En lo que a la temperatura se refiere, resulta interesante destacar el trabajo de Cameron y Hou⁴² en el que es evaluado el efecto *in vitro* a nivel celular de la quimioterapia hipertérmica en diversas líneas celulares. El tiempo de aplicación empleado es de 60 minutos y las temperaturas empleadas de 45°C, 42°C y 37°C, centrándose el estudio en la temperatura de 42°C. En dicha publicación, los autores concluyen que el nivel de hipertermia requerido para una mayor efectividad sería el de 45°C, afirmando al mismo tiempo que la aplicación de dicha temperatura resulta inviable en la práctica clínica por los efectos secundarios asociados.

Queda patente que la mayor parte de los estudios emplean temperaturas de 42°C a 43°C y un tiempo de exposición que en general no suele superar las 2 hs.

En nuestro estudio, al determinar el porcentaje de apoptosis de las células neoplásicas en tras el efecto combinado de la hipertermia y el citostático, resultó llamativo que éste resultó mayor a 40°C + cisplatino (1,80) que a 42°C + cisplatino (1,59), siendo estos resultados estadísticamente significativos.

Este resultado probablemente estaría en relación con el hecho de que un mayor aumento de temperatura, en conjunto con el citostático, se asociaría a una mayor destrucción celular, que se vería seguida de un detrimento en la inducción de apoptosis en favor de la aparición de necrosis celular.

Teniendo en cuenta este resultado, así como el efecto potencialmente lesivo de la hipertermia en los tejidos sanos de los pacientes, decidimos evaluar el efecto de la temperatura de 40°C (aislada y asociada al citostático), en la inducción de expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en las células neoplásicas.

Los resultados del incremento de temperatura a 40°C asociado a la aplicación de cisplatino, ya han sido discutidos, quedando demostrado que dicha combinación induce cambios ostensibles en la expresión proteica con el efecto final de la inducción de apoptosis efectiva en las células neoplásicas estudiadas.

Si bien nuestro estudio cuenta con un escaso número de muestras, basados en nuestros resultados podemos decir que en nuestra experiencia la quimioterapia hipertérmica empleando una temperatura de 40°C resulta efectiva en la inducción de apoptosis efectiva en células neoplásicas. Teniendo en cuenta que la aplicación de dicha temperatura en la clínica se asociaría a una menor agresión en los tejidos sanos, consideramos que podría considerarse su elección como opción válida en este tipo de tratamientos.

En la actualidad no se dispone de estudios que comparen el efecto asociado a un mayor o menor tiempo de exposición o aplicación de la quimioterapia hipertérmica y tampoco nuestro estudio se ha centrado en este aspecto en concreto. No obstante el tiempo de 2 horas que hemos empleado podría resultar adecuado, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestra experiencia.

Si bien no es posible establecer en la actualidad con un claro grado de certeza una determinada temperatura ni un determinado tiempo de aplicación como los más idóneos en este tipo de terapia, los datos de nuestro estudio apoyan que una temperatura de 40°C y un tiempo de exposición de 2 horas se ven seguidos, a nivel celular *in vitro*, del efecto esperado en términos de apoptosis celular.

**6.- ¿Es adecuada la elección del cisplatino como agente citostático?
¿Deberían considerarse otros fármacos o asociaciones de ellos en este tipo de tratamiento? ¿Resulta efectiva la dosis de cisplatino empleada?**

En la actualidad el esquema de tratamiento quimioterápico sistémico del mesotelioma pleural maligno, del carcinoma broncogénico y de varios tumores ginecológicos se basa en la administración de platinos^{67,68,69,70,71,72,73,74,75,76}.

De manera generalizada, la mayor parte de los grupos de trabajo que investigan la quimioterapia hipertérmica en la clínica, emplean el cisplatino como agente citostático de elección. En numerosos casos, los resultados evaluados apuntan a una mejoría en el control local de las neoplasias⁵⁹.

En nuestra experiencia, al analizar la respuesta celular en lo que se refiere a la expresión de proteínas, la aplicación aislada de cisplatino se vio seguida de una respuesta algo heterogénea en la concentración de las proteínas cuantificadas, con elevación y descenso tanto de proteínas con acción proapoptótica como antiapoptótica. Se pudo observar descenso en todas las proteínas de la familia Bcl-2 (apoptóticas y antiapoptóticas), con elevación de Pro-Caspasa 3, HTRA2/Omi, Smac/Diablo y Citocromo C, apuntando a una preferencia celular por la vía intrínseca, tras el efecto del citostático. En cuanto a las proteínas con acción antiapoptótica, únicamente se constató elevación de XIAP y de la citoprotectora Hsp70.

Dichos resultados podría estar en relación con el hecho general de que muy posiblemente existe un importante defecto funcional en la señalización de la apoptosis en las células neoplásicas, lo cual explicaría la escasa respuesta de muchos tipos de tumores a la quimioterapia y la radioterapia. Es de sobra conocido el hecho de que las células tumorales malignas son capaces de hacer frente al estrés y de eludir el efecto de diversos fármacos mediante la regulación en la expresión y función de diversas proteínas, como sería por ejemplo el caso de la fosforilación aberrante de la Hsp27⁷⁷.

Ello explicaría que la adicción de cisplatino se vea seguida, en nuestra experiencia, de la elevación de unas determinadas proteínas y del decremento en la expresión de otras (familia Bcl-2).

Por otra parte al determinar el comportamiento celular en términos de apoptosis en las células tumorales de nuestro estudio, la adicción de cisplatino, tanto aislada como asociada al incremento térmico, mostró un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de apoptosis.

La simple adicción de cisplatino (comparación de apoptosis entre las muestras a 37°C y 37°C + cisplatino) se vio seguida de un incremento en el porcentaje de apoptosis con significación estadística pasando de 1 a 1,43. Igualmente, al analizar los cambios en la expresión proteica, pudo observarse que las modificaciones al comparar las muestras a 37°C + cisplatino y 40°C + cisplatino, resultaron mucho más ostensibles que las observadas por la acción aislada de la temperatura (37°C y 40°C), constatándose una elevación importante en la concentración de la casi totalidad de las proteínas con acción pro y antiapoptótica.

El estudio ya referido de Cregan⁶¹, evidenció que existe diferente sensibilidad célula-dependiente y droga-dependiente en lo que a la inducción de apoptosis en las células neoplásicas se refiere. También los resultados ya comentados del estudio de Zanardelli⁶², apuntan a la activación de vías alternativas para la producción de apoptosis en determinadas células neoplásicas, en relación con la aplicación de algunos citostáticos concretos (oxaliplatino). Por ello, la investigación de estas vías alternativas que regulan la apoptosis en las células tumorales, debidas probablemente a sobreexpresión e infrarregulación de diferentes proteínas implicadas en el proceso, resulta imprescindible para poder establecer nuevas dianas terapéuticas y por tanto terapias más efectivas en el control de estas enfermedades.

Aunque la mayor parte de las publicaciones sobre quimioterapia aislada y quimioterapia hipertérmica intrapleural emplean el cisplatino como agente citostático único, también existen trabajos de diversos grupos que han ensayado combinaciones de fármacos asociando diversos citostáticos al cisplatino. Así mismo, existen algunos estudios en los que se han empleado agentes quimioterápicos diferentes a los platinos.

Cameron y Hou⁴² al estudiar el efecto de la quimioterapia hipertérmica *in vitro*, compararon el efecto del cisplatino aislado y de combinaciones de cisplatino con otros fármacos (gemcitabina y pemetrexed), concluyendo que al igual que en el tratamiento sistémico, el empleo de la combinación de más de un fármaco resulta más efectivo que la monoterapia.

Respecto a los estudios en los que se emplean distintas combinaciones de citostáticos sin hipertermia asociada, Figlin²⁸ utiliza cisplatino y citarabina en pacientes con afectación por diferentes neoplasias, sin poder concluir mejores resultados que los de los agentes esclerosantes clásicos. Thoda²⁹ encuentra que la asociación de cisplatino y etopósido resulta efectiva en pacientes con diseminación pleural de carcinoma broncogénico. Shoji³⁰ ensayó la administración de cisplatino y 5-fluorouracilo en enfermos con derrame pleural secundario a mesotelioma, carcinoma de pulmón y carcinoma de mama, objetivando mejoría en la supervivencia. En lo referente a estos estudios, debemos señalar que Shoji administra repetidas veces la combinación de fármacos, mientras que en los otros casos referidos la administración de quimioterapia intrapleural es única.

Existen así mismo algunas publicaciones en las que se han ensayado citostáticos diferentes al cisplatino. Podemos referir que Jones³⁵ tras administrar docetaxel a pacientes con afectación pleural por diferentes tipos de tumores, concluye que no es posible asegurar la efectividad de este tratamiento. Lombardi³⁸ encuentra que la administración de paclitaxel en la afectación pleural por carcinoma mamario y ovárico, ofrece un buen control del derrame mejorando la calidad de vida, y en determinadas pacientes, una discreta mejoría en la supervivencia. El estudio recientemente publicado por Chen⁷⁸, ensaya la asociación de pemetrexed y bevacizumab intrapleural sin hipertermia en el tratamiento del mesotelioma maligno. De manera concomitante al tratamiento locorregional, se administró cisplatino y pemetrexed a nivel sistémico. En el estudio participaron 23 pacientes y los resultados muestran un discreto aumento en el periodo libre de enfermedad y en la supervivencia global de los enfermos.

En lo referido a la dosis de citostático a emplear existe una importante diversidad y heterogeneidad al respecto según la publicación que analicemos, como ya ha quedado patente en la introducción del presente trabajo. En nuestro caso, para la experimentación en el modelo murino que se realizó como trabajo previo al que nos ocupa, se eligió la dosis de 33,7 microgramos por mililitro de cisplatino, basándonos en un estudio de Matsuzaki⁷⁹ llevado a cabo en pacientes con diseminación pleural de adenocarcinoma broncogénico y mamario. En dicho trabajo se administraron 200 mg/m² de cisplatino en 2 litros de solución salina a 43°C durante 2 hs. No se apreciaron efectos adversos relevantes y la concentración máxima de la forma libre (activa) de cisplatino en líquido pleural resultó de 33,7 microgramos por mililitro. Dado que los resultados en el modelo animal resultaron satisfactorios, decidimos mantener la misma dosis de citostático en el estudio *in vitro* con células pleurales humanas neoplásicas. En este sentido podemos concluir que los resultados obtenidos en dicho trabajo, objeto de la presente discusión, también han resultado satisfactorios, por lo que consideramos que la dosis de citostático empelada resulta efectiva en la inducción de apoptosis *in vitro* en células tumorales pleurales humanas.

Teniendo en cuenta los resultados de nuestro estudio, consideramos que el efecto del cisplatino a nivel de la inducción de apoptosis celular *in vitro* en células neoplásicas queda demostrado, por lo que en la actualidad podría considerarse como el citostático de elección en este tipo de terapias. No obstante, considerando los resultados de otras publicaciones, debe tenerse en cuenta que la asociación de más de un fármaco podría mejorar la efectividad de este tipo de terapia, por lo que es aconsejable proseguir la investigación en este sentido, con el fin de poder establecer en el futuro nuevos esquemas terapéuticos que ofrezcan mejores resultados a los pacientes.

7.- ¿Es posible establecer en la actualidad un protocolo de tratamiento intrapleural en las neoplasias localizadas a este nivel?

En los últimos años se han publicado estudios que parecen demostrar efectos beneficiosos de la quimioterapia hipertérmica intrapleural, con mejoría en el tiempo de libre de enfermedad y supervivencia global^{60,61}. No obstante son aún muchas las incógnitas pendientes de resolver. Como afirma Ried⁵⁹ en las conclusiones de su artículo publicado en este mismo 2015, únicamente con la persistencia en la investigación y la obtención de mayores grados de evidencia, se podrá validar el tipo de agente quimioterápico y las condiciones clínicas óptimas de aplicación de la quimioterapia hipertérmica.

También Cameron y Hou⁴² concluyen que no es posible aún establecer un protocolo óptimo de aplicación clínica de quimioterapia hipertérmica intrapleural, dado que resulta difícil proponer una determinada temperatura, tiempo de exposición y dosis de cistostático. Por su parte Migliore⁶⁸ afirma en una reciente publicación, que la quimioterapia hipertérmica es una adecuada opción de tratamiento en pacientes con mesotelioma, pero que para su pleno establecimiento son necesarios ensayos clínicos randomizados.

Publicaciones recientes de Wang⁸⁰ y Zhang⁸¹, muestran resultados alentadores en lo que a nuevas dianas de tratamiento antineoplásico se refiere. La regulación mediante inhibición de la función y síntesis de algunas proteínas y enzimas implicadas en el proceso de apoptosis (Hsp90, Bcl-2 y Caspasa-3), parecen relacionarse con la inhibición en la progresión de determinadas neoplasias, como es el caso del carcinoma escamoso esofágico y del adenocarcinoma de cuello uterino.

Basándonos en estas afirmaciones y en los resultados de nuestra propia experiencia, podemos concluir que en la actualidad no se dispone de datos que permitan establecer con la suficiente fiabilidad un determinado esquema de tratamiento. No obstante los resultados en lo que a la efectividad de este tipo de terapias se refiere son alentadores.

En suma, los estudios de los que se dispone hasta el momento son heterogéneos en cuanto a la temperatura, dosis y tipo de citostático empleado, tiempo de exposición y características de los pacientes incluidos. Por otra parte, en su mayoría adolecen de un escaso tamaño muestral. Todo ello hace que sea necesario proseguir la investigación en este campo, con el fin de resolver las incógnitas que todavía se plantean y así poder establecer un protocolo concreto de tratamiento.

Por todos los motivos referidos, aclarar las vías de ejecución de la apoptosis en las diversas células neoplásicas, la respuesta de las mismas a los diferentes citostáticos, así como establecer la temperatura y tiempo de exposición que resulten más efectivos en la inducción del proceso apoptótico con la menor agresión de las células sanas, son retos que deben centrar el estudio futuro en lo que a la terapia con quimioterapia hipertérmica intrapleural se refiere.

Conclusiones

1. La infiltración neoplásica de la pleura condiciona un importante reto terapéutico en la actualidad así como un relevante problema de salud pública en relación a su elevada incidencia y síntomas asociados. La investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos que mejoren el control del proceso y aporten mayor supervivencia y calidad de vida a los pacientes, se hace por tanto imprescindible.
2. La quimioterapia hipertérmica intrapleural parece ofrecer resultados prometedores en este tipo de pacientes, si bien sus mecanismos de acción a nivel celular y biomolecular no están aun suficientemente aclarados.
3. Los resultados de nuestro estudio demuestran que a nivel de las células pleurales neoplásicas humanas la hipertermia no es capaz de inducir por sí misma *in vitro* un porcentaje de apoptosis efectivo.
4. En nuestra experiencia, el efecto *in vitro* per se del cisplatino, a la dosis de 33,7 microgramos por mililitro, se traduce en la inducción de un porcentaje significativo de apoptosis en las células pleurales neoplásicas humanas.
5. En el presente trabajo hemos podido determinar que *in vitro* el efecto combinado de la hipertermia y el cisplatino en las células pleurales neoplásicas humanas se sigue de un significativo incremento en el porcentaje de apoptosis.
6. Nuestros resultados muestran que *in vitro* el efecto de la quimioterapia hipertérmica en células pleurales humanas neoplásicas, induce cambios ostensibles en la expresión de las principales proteínas implicadas en el proceso de la apoptosis celular.

7. De lo observado en este trabajo, podemos inferir que para cada tipo histológico tumoral existen diferentes vías preferenciales de ejecución de la apoptosis. En los adenocarcinomas poco diferenciados representada por la síntesis de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 y en los adenocarcinomas bien diferenciados por la escasa expresión de Pro-Caspasa 3.
8. En lo que se refiere al efecto sinérgico *in vitro* del citostático y la elevación térmica del medio, nuestro estudio objetiva que a temperatura de 40°C la adicción de cisplatino se ve seguida de un significativo incremento del porcentaje de apoptosis celular en células neoplásicas pleurales humanas.
9. Complementariamente, nuestra experiencia ha permitido observar que el porcentaje de apoptosis celular tras la administración de cisplatino a temperatura de 42°C es menor que el observado a temperatura de 40°C, probablemente en razón del mayor grado de necrosis celular asociado a una temperatura más elevada (42°C).
10. La exposición *in vitro* de las células pleurales tumorales humanas al cisplatino, se ve seguida de cambios en la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis. La elevación selectiva de las proteínas Pro-Caspasa 3, HTRA2/Omi, Smac/Diablo y Citocromo C, se correspondería con la inducción preferencial de la vía intrínseca para la ejecución de la apoptosis.
11. El efecto *in vitro* del cisplatino durante 2 horas a temperatura de 40°C se ve seguido de una importante variación en la expresión proteica celular, con elevación muy significativa de la casi totalidad de proteínas proapoptóticas e incremento de algunas antiapoptóticas.

12. A pesar de que en la actualidad no es posible establecer un protocolo definitivo de tratamiento con quimioterapia hipertérmica intrapleural, basados en los resultados de nuestro estudio podemos afirmar que la administración de una dosis de 33,7 microgramos por mililitro de cisplatino a temperatura de 40°C durante 2 horas, resulta efectiva *in vitro* en la inducción de apoptosis celular en células pleurales neoplásicas humanas.

13. La investigación de vías concretas de ejecución de la apoptosis en los diferentes tipos de tumores y la asociación a la hipertermia de otros citostáticos diferentes al cisplatino, deberían ser el objetivo de las investigaciones futuras a fin de mejorar la modalidad y pauta de este tipo de tratamiento.

Bibliografía

1. Ried M, Hofmann HS. The treatment of pleural carcinosis with malignant pleural effusion. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(18):313-8.
2. Thomas JM, Musani AI. Malignant pleural effusions: a review. *Clin Chest Med* 2013 ; 34(3): 459-71.
3. Adult chest surgery. David J. Sugarbaker, Raphael Bueno, Mark J. Krasna, Steven J. Mentzer, Lambros Zellos. McGraw-Hill Companies. ISBN 973-0-07-145912-9. Part 13 : Diffuse pleural malignancies and effusions. Chapter 103.- Extrapleural pneumonectomy for diffuse malignant pleural mesothelioma and other diffuse pleural malignancies : introduction.
4. Roberts ME, Neville E, Berrisford RG, Antunes G, Ali NJ, BTS Pleural Disease Guideline Group. Management of a malignant pleural effusion : British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax* 2010; 65 (Suppl 2): ii32-40.
5. Haas AR, Sterman DH. Intracavitary therapeutics for pleural malignancies. *Clin Chest Med* 2013; 34(3): 501-13.
6. Astoul P, Viallat JR, Laurent JC, et al. Intrapleural recombinant IL-2 in passive immunotherapy for malignant pleural effusion. *Chest* 1993; 103(1): 209-13.
7. Christmas TI, Manning LS, Garlepp MJ, et al. Effect of interferon-alpha 2a on malignant mesothelioma. *J Interferon Res* 1993; 13(1): 9-12.
8. Boutin C, Viallat JR, Van Zandwijk N, et al. Activity of intrapleural recombinant gamma-interferon in malignant mesothelioma. *Cancer* 1991; 67(8):2033-7.

9. Boutin C, Nussbaum E, Monnet I, et al. Intrapleural treatment with recombinant gamma-interferon in early stage malignant pleural mesothelioma. *Cancer* 1994; 74(9):2460-7.
10. Yanagawa H, Haku T, Hiramatsu K, et al. Intrapleural instillation of interferon gamma in patients with malignant pleurisy due to lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 45(2):93-9.
11. Goey SH, Eggermont AM, Punt CJ, et al. Intrapleural administration of interleukin 2 in pleural mesothelioma: a phase I-II study. *Br J Cancer* 1995; 72(5):1283-8.
12. Sartori S, Tombesi P, Tassinari D, et al. Prospective randomized trial of intrapleural bleomycin versus interferon alfa-2b via ultrasound-guided small-bore chest tube in the palliative treatment of malignant pleural effusions. *J Clin Oncol* 2004; 22(7):1228-33.
13. Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, et al. Locoregional immunotherapy of malignant efusión from colorectal cancer using the streptococcal preparation OK-432 plus interleukin-2: induction of autologous tumor-reactive DC4+ Th 1 killer lymphocytes. *Br J Cancer* 2003; 89(10):1876-84.
14. Ren S, Terman DS, Bohach G, et al. Intrapleural staphylococcal superantigen induces resolution of malignant pleural effusions and a survival benefit in non-small cell lung cancer. *Chest* 2004; 126(5): 1529-39.
15. Stermán DH, Treat J, Litzky LA, et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* 1998; 9(7):1083-92.

16. Hortobagyi GN, Ueno NT, Xia W, et al. Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J Clin Oncol* 2001; 19(14):3422-33.
17. Tiberghien P. Use of suicide genes in gene therapy. *J Leukoc Biol* 1994; 56(2):203-9.
18. Pope IM, Poston GJ, Kinsella AR. The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur J Cancer* 1997; 33(7):1005-16.
19. Leong CC, Marley JV, Loh S, et al. The induction of immune responses to murine malignant mesothelioma by IL-2 gene transfer. *Immunol Cell Biol* 1997; 75(4):356-9.
20. Addison CL, Braciak T, Ralston R, et al. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(18):8522-6.
21. Dong M, Li X, Hong LJ, et al. Advanced malignant pleural or peritoneal effusion in patients treated with recombinant adenovirus p53 injection plus cisplatin. *J Int Med res* 2008; 36(6):1273-8.
22. Zhao WZ, Wang JK, Li W, et al. Clinical research on recombinant human Ad-p53 injection combined with cisplatin in treatment of malignant pleural effusion induced by lung cancer. *Ai Zheng* 2009; 28(12):1324-7.
23. Selvaraj P, Yerra A, Tien L, et al. Custom designing therapeutic cancer vaccines: delivery of immunostimulatory molecule adjuvants by protein transfer. *Hum Vaccin* 2008; 4(5):384-8.

24. Giovanella BC, Stehlin JS, Morgan AC. Selective lethal effect of supranormal temperatures on human neoplastic cells. *Cancer research* 1976; 36(11 Pt 1): 3944-50.
25. Spratt JS, Adcock RA, Sherrill W, et al. Hyperthermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res* 1980; 40(2):253-5.
26. Tsao AS, Mehran R, Roth JA. Neoadjuvant and intrapleural therapies for malignant pleural mesothelioma. *Clin Lung Cancer* 2009; 10 (1):36-41.
27. Alberts DS, Peng YM, Chen HS, et al. Therapeutic synergism of hyperthermia-cisplatin in a mouse tumor model. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65(2):455-61.
28. Figlin R, Mendoza E, Piantadosi S, et al. Intrapleural chemotherapy without pleurodesis for malignant pleural effusions. *LCSG trial 861. Chest* 1994; 106 (6 Suppl):363S-366S.
29. Thoda Y, Iwanaga T, Takada M, et al. Intrapleural administration of cisplatin and etoposide to treat malignant pleural effusions in patients with non-small cell lung cancer. *Chemotherapy* 1999; 45(3):197-204.
30. Shoji T, Tanaka F, Yanagihara K, et al. Phase II study of repeated intrapleural chemotherapy using implantable access system for management of malignant pleural effusion. *Ches* 2002; 121(3):821-4.
31. Chang M.Y, Sugarbaker D.J. Innovative therapies: intraoperative intracavitary chemotherapy. *Thorac Surg Clin* 2004; 14 (4):549-556.

32. Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, et al. Intrapleural hyperthermic perfusion with chemotherapy increases apoptosis in malignant pleuritis. *Ann Thorac Surg* 2004; 78(5):1769-72.
33. Seto T, Ushijima S, Yamamoto H, et al. Intrapleural hypotonic cisplatin treatment for malignant pleural effusion in 80 patients with non-small-cell lung cancer: a multi-institutional phase II trial. *Br J Cancer* 2006; 95(6):717-21.
34. Matsuzaki Y, Tomita M, Shimizu T, et al. Induction of apoptosis by intrapleural perfusión hyperthermo-chemotherapy for malignant pleural mesotelioma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 14(3):161-5
35. Jones DR, Taylor MD, Petroni GR, et al. Phase I trial of intrapleural docetaxel administered through an implantable catheter in subjects with a malignant pleural effusion. *J Thorac Oncol* 2010; 5(1):75-81.
36. Kimura M, Tojo T, Naito H, et al. Effects of simple intraoperative intrathoracic hyperthermotherapy for lung cáncer with malignant pleural effusion or dissemination. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010; 10(4):568-71.
37. Chen WJ, Yuan SF, Yan QY, et al. Intrapleural chemo- and hyperthermotherapies for malignant pleural effusion: a randomized prospective study. *Cancer Invest* 2012; 30(2):126-30.
38. Lombardi G, Nicoletto MO, Gusella M, et al. Intrapleural paclitaxel for malignant pleural effusion from ovarian and breast cancer: a phase II study with pharmacokinetic analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69(3):781-7.

39. Yu L, Jing Y, Ma S, et al. Cytoreductive surgery combined with hyperthermic intrapleural chemotherapy to treat thymoma or thymic carcinoma with pleural dissemination. *Onco Targets Ther* 2013; 10(6):517-21.
40. Ried M, Potzger T, Braune N, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intrathoracic chemotherapy perfusion for malignant pleural tumours: perioperative management and clinical experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013; 43(4):801-7.
41. Du N, Li X, Li F, et al. Intrapleural combination therapy with bevacizumab and cisplatin for non-small cell lung cancer-mediated malignant pleural effusion. *Oncol Rep* 2013; 29(6):2332-40.
42. Cameron R.B, Hou D. Intraoperative hyperthermic chemotherapy perfusion for malignant pleural mesothelioma: an in vitro evaluation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 145(2):496-504.
43. F. Heras Gómez, B. Gregorio Crespo, J.M. Matilla González, S. Cabanyes Candela, N. Fernández García, M. Sánchez crespo, A. Cilleruelo ramos, G. Ramos Seisdedos, M. García Yuste. Efectos de la hipertermia en las células mesoteliales pleurales: expresión de proteínas inflamatorias y muerte celular. Comunicación Oral en el 27 Congreso Nacional de Cirugía. Madrid 3-6 de Noviembre de 2008.
44. F. Heras Gómez, J.M. Matilla González, S. Cabanyes Candela, B. Gregorio Crespo, A. Cilleruelo Ramos, N. Fernández García, M. Sánchez Crespo, G. Ramos Seisdedos, M. García Yuste. Efecto comparativo de la hipertermia vs hipertermia y cisplatino en la inducción de muerte celular en las células mesoteliales pleurales. Comunicación Oral en el 27 Congreso Nacional de Cirugía. Madrid 3-6 de Noviembre de 2008.

45. Gregorio B, Heras F, Matilla J.M, Cabanyes S, Fernández-García N, Sánchez-Crespo M, Cilleruelo A, Ramos G, García-Yuste M. Effects of hyperthermia on pleural mesothelial cells: expression of inflammatory proteins and cellular death. Oral Presentation on 16 th European Conference On General Thoracic Surgery. Bologna, 8–11 June 2008.
46. Matilla J.M, Heras F, Cabanyes S, Gregorio B, Fernández-García N, Sánchez-Crespo M, Cilleruelo A, Ramos G, García-Yuste M. Comparative effect of hyperthermia vs hyperthermia-cisplatinum in the death induction of the pleural mesothelial cell. Oral Presentation on 16 th European Conference On General Thoracic Surgery. Bologna, 8–11 June 2008.
47. Refaely Y, Simansky DA, Paley M, et al. Resection and perfusión thermochemotherapy: a new approach for the treatment of thymic malignancies with pleural spread. *Ann Thorac surg* 2001; 72(2):366-70.
48. Tilleman TR, Richards WG, Zellos L, et al. Extrapleural pneumonectomy followed by intracavitary intraoperative hyperthermic cisplatin with pharmacologic cytoprotection for treatment of malignant pleural mesothelioma: a phase II prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138(2):405-11.
49. Su WC, Kitagawa M, Xue N, et al. Combined intrapleural and intravenous chemotherapy, and pulmonary irradiation, for treatment of patients with lung cáncer presenting with malignant pleural effusion. A pilot study. *Oncology* 2003; 64(1).18-24.
50. Averbach A, Sugarbaker P. Methodological considerations in treatment using intraperitoneal chemotherapy. In: Sugarbaker P, editor. *Peritoneal carcinomatosis: principles of management*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1996. P. 289-309.

51. Martínez Salazar M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev Colomb Biotecnol* 2009; 11(2):152-166.
52. Cascales Angosto M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Natl Farm* 2003; 69(1):36-59.
53. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol pathol* 2007; 35(4):495-516.
54. Coronato S, Di Girolamo W, Salas M, et al. Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina* 1999; 59: 477-486.
55. de Bree E, van Ruth S, Baas P, et al. Cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy in patients with malignant pleural mesotelioma or pleural metastases of thymoma. *Chest* 2002; 121:480-7.
56. Sugarbaker DJ, Gill RR, Yeap BY, et al. Hyperthermic intraoperative pleural cisplatin chemotherapy extends interval of recurrence and survival among low-risk patients with malignant pleural mesothelioma undergoing surgical macroscopic complete resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 45:955-63.
57. Yellin A, Simansky DA, Ben-Avi R, et al. Resection and heated pleural chemoperfusion in patients with thymic epithelial malignant disease and pleural spread: a single-institution experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 145:83-9.
58. Isik AF, Sanli M, Yilmaz M, et al. Intrapleural hyperthermic perfusion chemotherapy in subjects with metastatic pleural malignancies. *Respir Med* 2013; 107(5):762-7.

59. Ried M, Lehle K, Neu R, et al. Assessment of cisplatin concentration and depth of penetration in human lung tissue after hyperthermic exposure. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015; 47:563-6.
60. Zhao P, Jiang H, Su D, et al. Inhibition of cell proliferation by mild hyperthermia at 43°C with Paris Saponin I in the lung adenocarcinoma cell line PC-9. *Mol Med Rep* 2015; 11(1):327-32.
61. Cregan I.L, Dharmarajan A.M, Fox S.A. Mechanism of cisplatin-induced cell death in malignant mesothelioma cells: role of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and caspases. *Int J Oncol* 2013; 42(2):444-452.
62. Zanardelli M, Micheli L, Nicolai R, et al. Different apoptotic pathways activated by oxaliplatin in primary astrocytes vs colo-rectal cancer cells. *Int J Mol Sci* 2015; 16:5386-5399.
63. Ba M, Long H, Wang Y, et al. Intrapleural hyperthermic perfusion using distilled water at 48°C for malignant pleural effusion. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139(12):2005-2012.
64. Falcieri E, Luchetti F, Burattini S, et al. Lineage-related sensitivity to apoptosis in human tumor cells undergoing hyperthermia. *Histochem Cell Biol* 2000; 113(2):135-44.
65. Harmon B.V, Takano Y.S, Winterford C.M, et al. The role of apoptosis in the response of cells and tumours to mild hyperthermia. *Int J Radiat Biol* 1991; 59(2):489-501.

66. Glory A, Bettaieb A, Averill-Bates D.A. Mild termotolerance induced at 40°C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *Int J Hyperthermia* 2014; 30(7):502-12.
67. Kao SC, van Zandwijk N, Clarke S, et al. Estimation of an optimal chemotherapy utilization rate for malignant pleural mesothelioma: an evidence-based benchmark for cancer care. *Asia Pac J Clin Oncol* 2015; 11(1):85-92.
68. Migliore M, Calvo D, Criscione A, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intrapleural chemotherapy for malignant pleural diseases: preliminary experience. *Future Oncol* 2015; 11(2):47-52.
69. Arnold DT, Hooper CE, Morley A, et al. The effect of chemotherapy on health-related quality of life in mesothelioma: results from the SWAMP trial. *Br J cancer* 2015; 112(7):1183-9.
70. Baldini EH, Richards WG, Gill RR, et al. Updated patterns of failure after multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 149(5):1374-81.
71. Gómez D, Tsao AS. Local and systemic therapies for malignant pleural mesothelioma. *Curr Treat Options Oncol* 2014; 15(4):683-99.
72. Liao BC, Shao YY, Chen HM, et al. Comparative effectiveness of first-line platinum-based chemotherapy regimens for advanced lung squamous cell carcinoma. *Clin Lung Cancer* 2015; 16(2):137-43.
73. de Marins F, Rossi A, Di Maio M, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer: Italian Association of Thoracic Oncology (AIOT) clinical practice guidelines. *Lung Cancer* 2011; 73(1):1-10.

74. Isakoff SJ, Mayer EL, He L, et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(17):1902-9.
75. Hu XC, Zhang J, Xu BH, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (CBCSG006): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(4):436-46.
76. Liutkauskiene S, Janciauskiene R, Jureniene K, et al. Retrospective analysis of the impact of platinum dose reduction and chemotherapy delays on the outcomes of stage III ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2015; 7(15):1104-5.
77. Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet* 2014; 5:1-5.
78. Chen D, Li X, Zhao H, et al. The efficacy of pemetrexed and bevacizumab intrapleural injection for malignant pleural mesothelioma-mediated malignant pleural effusion. *Indian J Cancer* 2014; 51 Suppl 3:e82-5.
79. Matsuzaki Y, Shibata K, Yoshioka M, et al. Intrapleural perfusión hyperthermo-chemotherapy for malignant pleural dissemination and effusion. *Ann Thorac Surg* 1995; 59:127-131.
80. Wang S, Du Z, Luo J, et al. Inhibition of heat shock protein 90 supresses squamous carcinogenic progression in a mouse model of esophageal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(8): 1405-16.
81. Zhang J, Wei H, Liu X, et al. Downregulation of phosphoglycerate dehydrogenase inhibits proliferation and enhaces cisplatin sensitivity in cervical adenocarcinoma cells by regulating Bcl-2 and caspase-3. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(4):541-8.

Anexos

Anexo I.- Modelo de consentimiento informado entregado a los pacientes para la inclusión en el estudio.

EFFECTO SOBRE LAS CÉLULAS MESOTELIALES PLEURALES DE LA HIPERTERMIA Y EL CIS-PLATINO: SINTESIS DE PROTEÍNAS PRO-INFLAMATORIAS Y APOPTOSIS CELULAR.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Estudio protocolizado de carácter prospectivo a realizar en el Hospital Universitario de Valladolid, con la concurrencia de la labor investigadora de los Servicios de Cirugía Torácica y Anatomía Patológica de este hospital, y la de investigadores pertenecientes al “Laboratorio de Investigación de Inflamación e Inmunidad Innata” del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM, Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

El objetivo de este estudio es el determinar en pacientes afectados de procesos patológicos pleurales, el efecto “in Vitro” sobre las células pleurales de la hipertermia y el cisplatino, mediante la constatación de la síntesis de proteínas pro-inflamatorias y producción de apoptosis en distintas condiciones térmicas y farmacológicas. Nuestra propia experiencia en este campo, y la derivada de los resultados obtenidos en el mismo por otros reconocidos grupos, justifica la continuidad de este tipo de investigación. El diseño de este estudio, ha sido sometido a la consideración previa de la Comisión de Ética del Hospital Universitario de Valladolid y oficialmente refrendado por la misma para su realización.

La información previa de la investigación a realizar, se verá complementada con la petición al paciente de la firma de un consentimiento informado que autorice al equipo investigador para su realización.

Tanto los datos clínicos, como los resultantes del análisis anatomopatológico y biomolecular de las muestras celulares pleurales, serán recogidos en un protocolo consensuado y elaborado por los investigadores de los Servicios de Cirugía Torácica y Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario y los del Instituto de Genética y Biología Molecular (IBGM), de Valladolid. Todos los datos derivados de la investigación, serán introducidos en el protocolo sin que figure en el mismo identificación alguna del paciente, salvo el número de registro correspondiente. El tratamiento informático y estadístico de los datos respetará formalmente las normas de confidencialidad y protección de datos.

CONSENTIMIENTO PARA INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO

De acuerdo con la información suministrada, autorizo a los investigadores pertenecientes a los Servicios de Cirugía Torácica y Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Valladolid y del Laboratorio de Investigación de Inflamación e Inmunidad Innata del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM, Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas), participantes en la realización de este proyecto, al estudio de mis datos clínicos y de los derivados de los resultados de la investigación planteada en relación con mi proceso pleural patológico.

Conforme el paciente D.

DNI

Lugar y Fecha

Firma

Revocación del consentimiento

Paciente D.

DNI

Lugar y Fecha

Firma

Anexo II.- Hoja de información escrita al paciente sobre el estudio.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: *EFECTO SOBRE LAS CÉLULAS MESOTELIALES PLEURALES DE LA HIPERTERMIA Y EL CIS-PLATINO: SINTESIS DE PROTEÍNAS PRO-INFLAMATORIAS Y APOPTOSIS CELULAR.*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. M. García-Yuste. Jefe de Cirugía Torácica. Servicio de Cirugía Torácica Hospital Clínico Universitario de Valladolid. 2ª Planta Norte. Teléfono: 983 420 000 Ext 298-271-910

CENTRO: Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente. Ley de Investigación biomédica. 14/2007, 3 de Julio (BOE 04-07-07). Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Estudio protocolizado de carácter prospectivo a realizar en el Hospital Universitario de Valladolid, con la concurrencia de la labor investigadora de los Servicios de Cirugía Torácica y Anatomía Patológica de este hospital, y la de investigadores pertenecientes al “Laboratorio de Investigación de Inflamación e Inmunidad Innata” del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM, Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

El objetivo de este estudio es el de determinar en pacientes que presenten enfermedades en la pleura (membrana que envuelve el pulmón), el efecto sobre las células pleurales de la hipertermia (aumento de temperatura) y el cisplatino (medicación quimioterápica), en cultivos de laboratorio.

Se procederá a constatar mediante pruebas de laboratorio, la producción de proteínas pro-inflamatorias (favorecedoras de inflamación) y de apoptosis (productoras de muerte de las células) en distintas condiciones de temperatura y aplicación de medicamentos, a las que serán sometidas las células obtenidas del paciente.

Para todo ello, se tomará una cantidad de líquido y/o tejido de la pleura, durante la realización de una exploración del tórax mediante videocirugía a la que será sometido el paciente debido a su enfermedad pleural.

El líquido y/o la biopsia pleural serán enviadas a los laboratorios correspondientes (ya citados al inicio de este documento) para su procesamiento.

La toma de dichas muestras del paciente, no condiciona riesgos añadidos a la exploración quirúrgica a la que se deberá someter debido a su enfermedad y que se realizará con intención diagnóstica y/o de tratamiento.

No se aplicarán aumentos de temperatura ni se administrarán medicamentos al enfermo, únicamente a las células procedentes de las muestras recogidas durante la cirugía.

No serán necesarias consultas ni pruebas añadidas a las que se realizarán de forma rutinaria debido a la intervención a la que se someterá el paciente.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Los beneficios que podrían obtenerse de este estudio, consisten en la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos que mejoren la calidad de vida y la supervivencia de pacientes con enfermedades pleurales.

El mismo equipo investigador de este estudio ha realizado investigaciones similares con células obtenidas de la pleura del ratón, presentando resultados favorables que aconsejan la investigación con células humanas para hacer posible el desarrollo de mejores tratamientos para estas enfermedades.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información referente a la técnica que será empleada en el estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca o porque consideren que no está cumpliendo con los criterios establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

En caso de duda, puede consultar con:

- Dra. M. Begoña Gregorio Crespo. F.E.A Cirugía Torácica. Hospital Clínico.
2ª Planta Norte. Teléfono 983 420 000 Extensiones: 20298-20910-20271
- Dr. F. Heras Gómez. F.E.A Cirugía Torácica. Hospital Clínico.
2ª Planta Norte. Teléfono 983 420 000 Extensiones: 20298-20910-20271
- Dr. M. García-Yuste. Jefe de Servicio Cirugía Torácica. Hospital Clínico.
Despacho Jefe de Servicio. 3ª Planta Este.

Tablas

PROTEINA	ACCIÓN	VÍA DE EJECUCIÓN
Pro-Caspasa 3	Proapoptótica	Intrínseca-Extrínseca
Citocromo C	Proapoptótica	Intrínseca
Bax	Proapoptótica	Intrínseca
Bad	Proapoptótica	Intrínseca
Smac/Diablo	Proapoptótica	Intrínseca
HTRA2/Omi	Proapoptótica	Intrínseca
XIAP	Antiapoptótica	Intrínseca-Extrínseca
Bcl-2	Antiapoptótica	Intrínseca
Bcl-x	Antiapoptótica	Intrínseca
Fas/TNFR-SF6	Proapoptótica	Extrínseca
FADD	Proapoptótica	Extrínseca

Tabla A.- Acción y vía de ejecución de la apoptosis de las proteínas determinadas en el estudio.

PROTEÍNA	TIPO Y FUNCIONES
Pro-Caspasa 3	Zimógeno inactivo, que se transforma en Caspasa 3: proteasa efectora o ejecutora de apoptosis.
Citocromo C	Proteína de la membrana mitocondrial. Activa el complejo proteico denominado "apoptosoma".
Smac/Diablo	Proteína de la membrana mitocondrial que bloquea la acción de las IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis).
HTRA2/Omi	Enzima (serina proteasa) mitocondrial. Mimetiza una caspasa y se une a las IAP (concretamente XIAP) bloqueando su acción.
XIAP	Proteína de la familia IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis). Inhibidor directo de caspasas 3,7 y 9.
Bax	Pertenece a la familia de proteínas Bcl-2: reguladoras de la permeabilidad de membrana mitocondrial. Subfamilia Bax. Acción proapoptótica por liberación de Citocromo C.
Bad	Pertenece a la familia de proteínas Bcl-2: reguladoras de la permeabilidad de membrana mitocondrial. Subfamilia BH3. Acción proapoptótica como iniciadora de la vía intrínseca.
Bcl-2	Pertenece a la familia de proteínas Bcl-2: reguladoras de la permeabilidad de membrana mitocondrial. Subfamilia Bcl-2. Acción antiapoptótica mediante bloqueo de las proteínas proapoptóticas de su propia familia (Bad, Bax).
Bcl-x	Pertenece a la familia de proteínas Bcl-2: reguladoras de la permeabilidad de membrana mitocondrial. Subfamilia Bcl-2. Acción antiapoptótica mediante bloqueo de las proteínas proapoptóticas de su propia familia (Bad, Bax).
Fas	También conocido como CD95. Receptor de muerte de la familia del TNFR. Tras unirse a su ligando (FasL) se inicia la transducción de la señal apoptótica de la vía extrínseca.
TNFR	Receptor de membrana. Receptor de muerte de la familia del TNF. Presentan dominio intracelular y extracelular. El dominio de muerte (DD – Death Domain) intracelular interviene en la producción de apoptosis al unirse a un ligando.
FADD	Molécula adaptadora. Se une a Fas – TNFR y activa a la pro-caspasa 8. Acción proapoptótica en la vía extrínseca.
Familia de proteínas Hsp	Proteínas con acción citoprotectora o estabilizadora, proteínas anti-estrés. Efecto inicial tipo antiapoptótico. Si el estímulo se mantiene su función se ve sobrepasada. Hsp70 ejerce efecto antiapoptótico al impedir la formación del apoptosoma. Hsp27 ejerce efecto antiapoptótico al interferir en la activación del complejo Citocromo C-Apaf-1/dATP.

Tabla B.- Tipo y funciones de las proteínas implicadas en la apoptosis celular.

Figuras

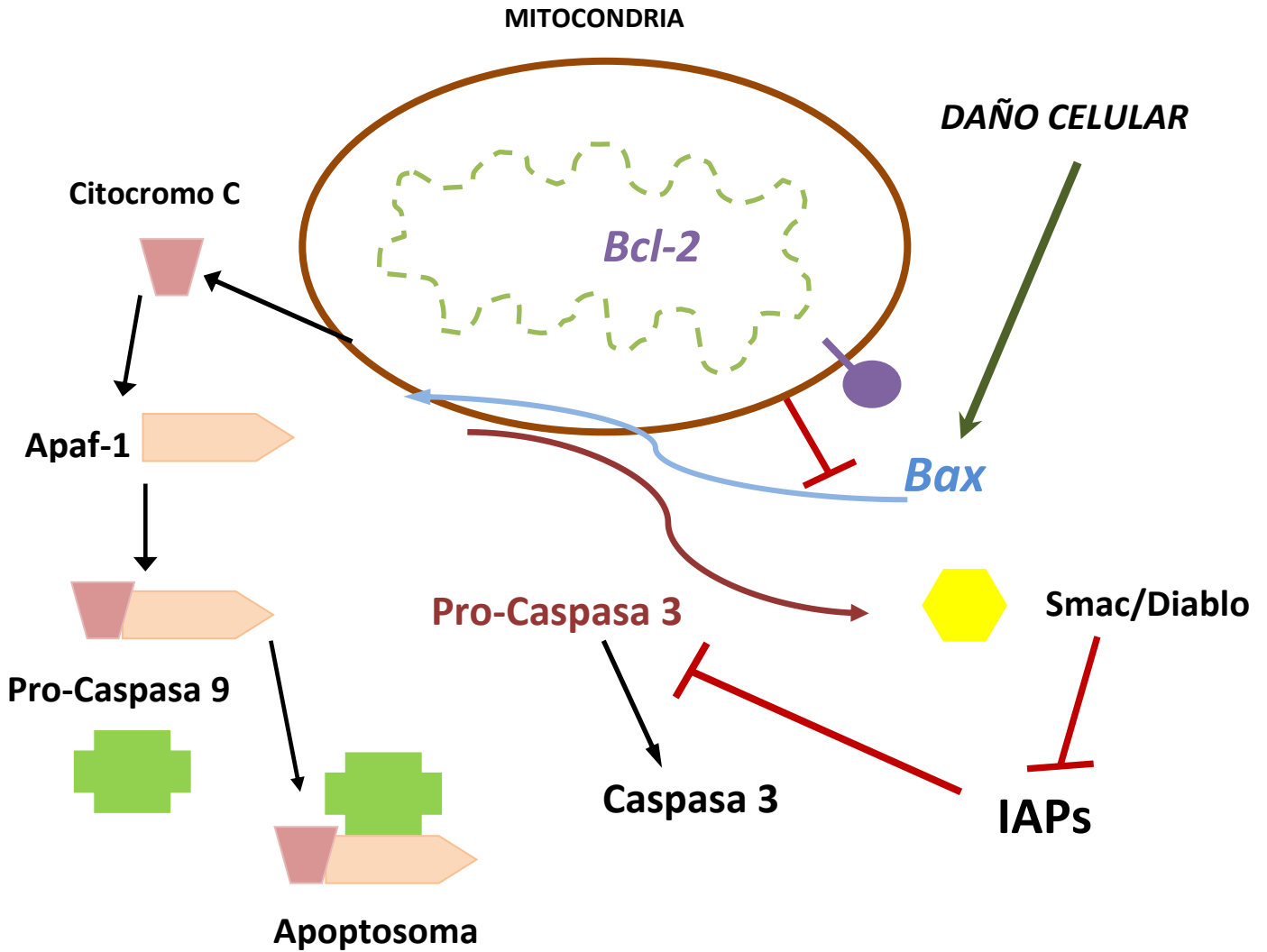


Figura A.- Esquema resumido de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis

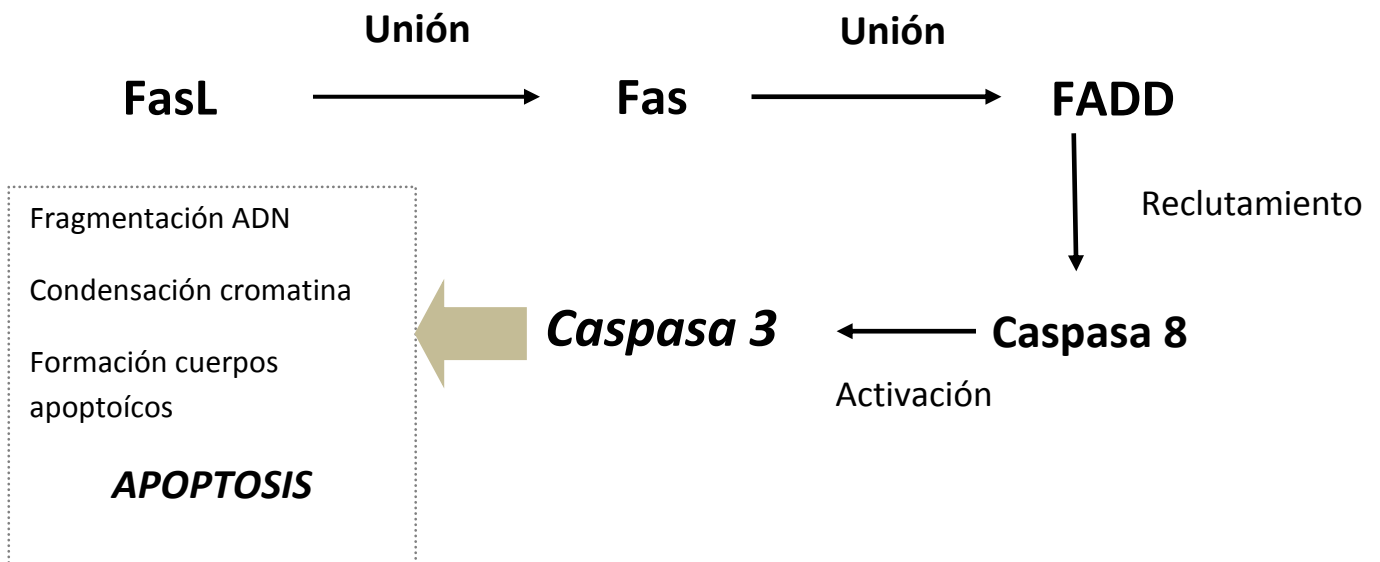
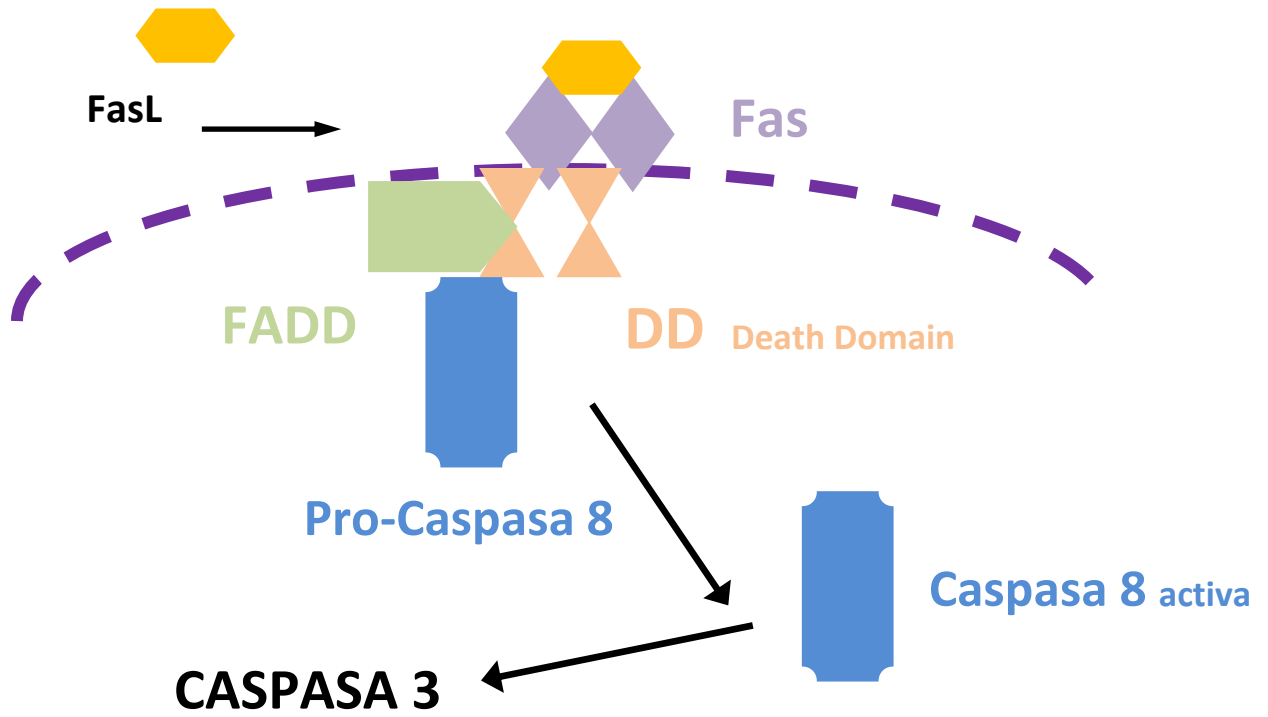


Figura B.- Esquema resumido de la vía extrínseca de la apoptosis

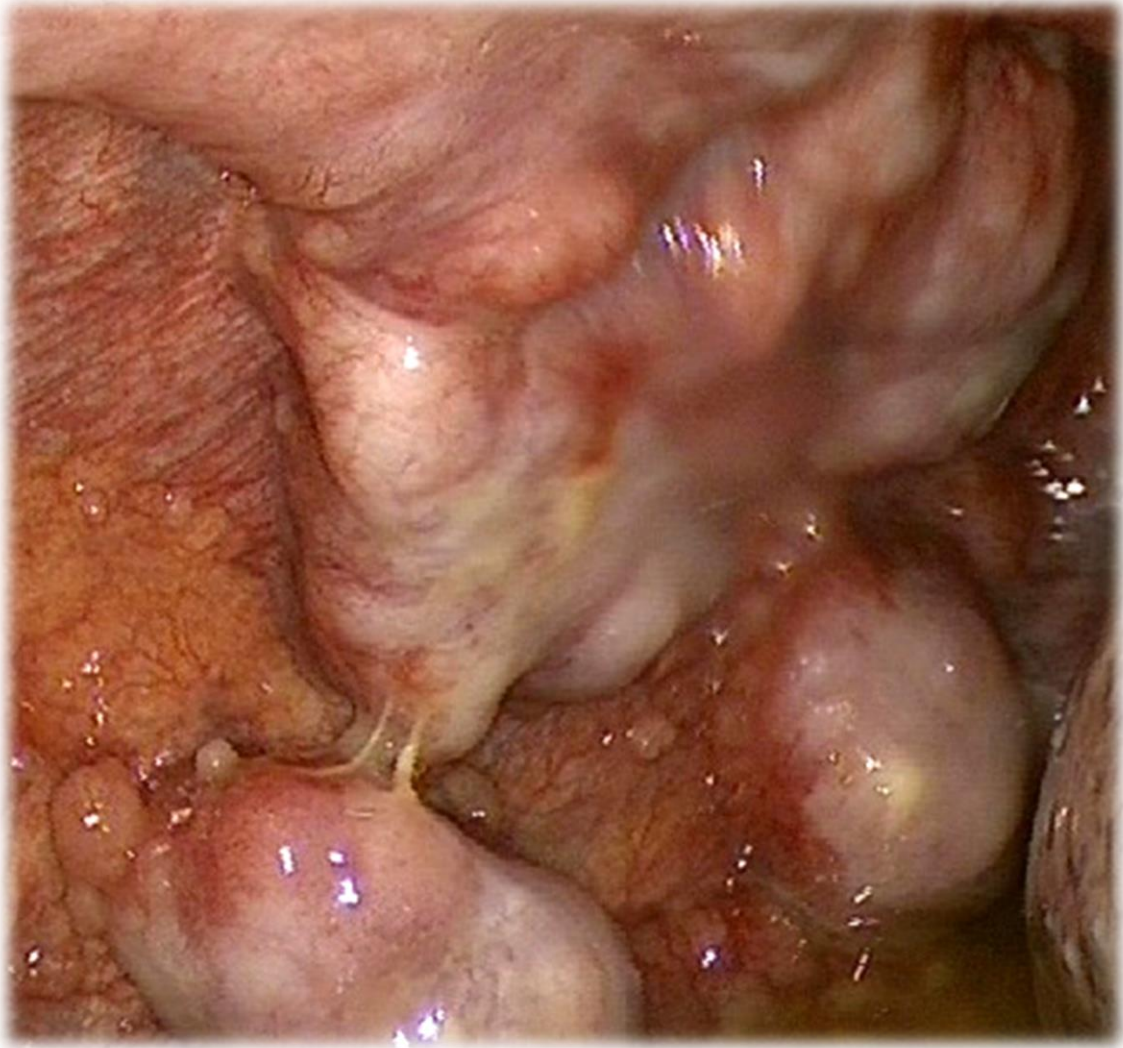


Figura C.- Infiltración neoplásica de la pleura parietal. Visión videotoracoscópica.

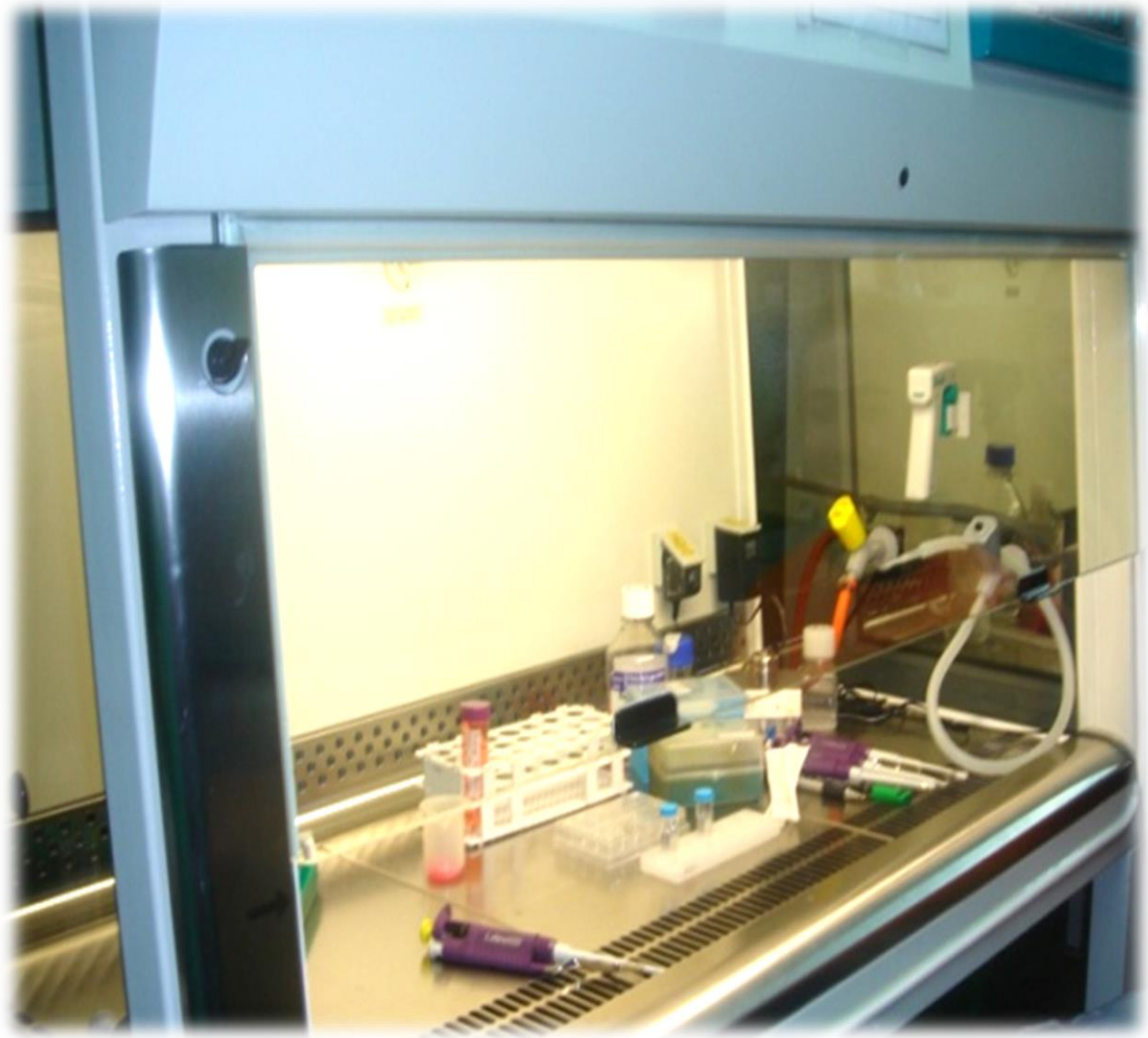


Figura D.- Campana de trabajo para procesamiento de muestras en medio estéril.

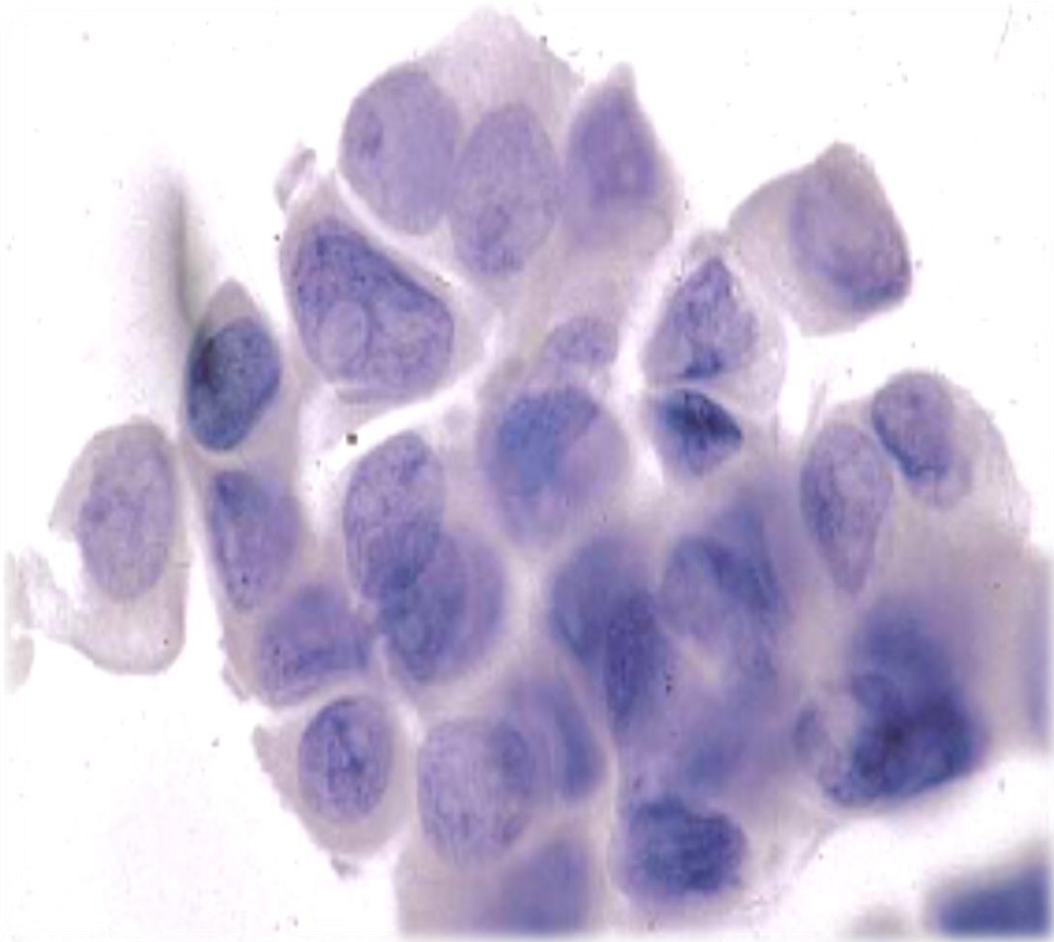


Figura E.- Tinción celular con fosfatidil serina para determinación de apoptosis celular.

FIGURAS

Gel name : p358 (Raw 1-D Image)



Index	Name	Volume OD*mm2	Adj. Vol. OD*mm2	% Adj. Vol.	Concentration
1	U1	6.724643047	6.724643047	7.67	N/A
2	U2	3.093815220	3.093815220	3.53	N/A
3	U3	3.080323319	3.080323319	3.51	N/A
4	U4	7.505919362	7.505919362	8.56	N/A
5	U5	0.744306733	0.744306733	0.85	N/A
6	U6	0.756624922	0.756624922	0.86	N/A
7	U7	1.442614994	1.442614994	1.65	N/A
8	U8	1.298043195	1.298043195	1.48	N/A
9	U9	0.256099514	0.256099514	0.29	N/A
10	U10	1.065722849	1.065722849	1.22	N/A
11	U11	1.001898921	1.001898921	1.14	N/A
12	U12	0.801078053	0.801078053	0.91	N/A
13	U13	0.723601759	0.723601759	0.83	N/A

Figura F.- Membrana de lectura de la expresión de proteínas y datos de concentración correspondientes a cada proteína, tras tratamiento informático.