



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**CURSO DE ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA**

**RESPUESTA TUMORAL EN RATONES DESNUDOS CON  
CARCINOMATOSIS PERITONEAL AL MANEJO CON  
HIPERTERMIA, QUIMIOTERAPIA HIPERTERMICA,  
ANTICUERPO MONOCLONAL ANTIANGIOGENICO  
INTRAOPERATORIO Y SU RELACION CON LA SOBRE  
EXPRESION DE VEGF**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN CIRUGIA ONCOLÓGICA DE

ADULTOS

**LUIS ALBERTO GARCÍA GONZÁLEZ**



DR. HECTOR MARTINEZ SAID  
DR FROYLAN LOPEZ LOPEZ  
DRA BLANCA A. SEGURA  
DIRECTOR DE TESIS  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
DR ÁNGEL HERRERA GÓMEZ

**MÉXICO, D.F.**

**2013**

**ASCESORES Y COLABORADORES**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

### ASESORES

|  |                            |
|--|----------------------------|
| <b>DR. FROYLAN LOPEZ LOPEZ*</b>                  | <b>Titular.</b>            |
| <b>DRA. BLANCA A. SEGURA**</b>                   | <b>Titular.</b>            |
| <b>DR. HECTOR MARTINEZ SAID***</b>               |                            |
| <b>DR GUSTAVO CABRERA AQUINO****</b>             | <b>Celulas SWIP2.</b>      |
| <b>DR. JOSE LUIS QUINTANAR STEPHANO*****</b>     | <b>Cultivos Celulares.</b> |
| <b>DR. JAVIER VENTURA JUAREZ*****</b>            | <b>Cultivos Celulares.</b> |
| <b>MA. DEL ROSARIO MONTOYA GARCIA*****</b>       | <b>Cultivos Celulares.</b> |
| <b>DRA MARIA DEL ROSARIO CAMPOS ESPARZA*****</b> | <b>Cultivos Celulares.</b> |
| <b>DRA. SARA ELI ARBOLEIDA NAVA*****</b>         | <b>Imagenologia RMN.</b>   |
| <b>DR. ANTONIO ROLON PADILLA*****</b>            | <b>Histopatologia.</b>     |
| <b>DR. ALEJANDO ALMANZA VAZQUEZ*****</b>         | <b>Estadistica.</b>        |
| <b>DR EFREN FLORES ALVAREZ*****</b>              | <b>Estadistica.</b>        |
| <b>DR MANUEL GUDIÑO AMEZCUA*****</b>             | <b>Quirurgico.</b>         |

### COLABORADORES.

**MONICA ENRIQUEZ NAJERA\*\*\*\*\***  
**LIZETH EUNICE LOPEZ MARTINEZ\*\*\*\*\***  
**JUAN JERONIMO GONZALEZ PACHECO\*\*\*\*\***  
**JAQUELIN PRECIADO VARGAS\*\*\*\*\***  
**VIOLETA AQUILAR ANALLA\*\*\*\*\***

\* **Dr. Especialista en Oncologia Medica CHMH**  
\*\* **Dra Ciencias biomédicas.**  
\*\*\* **Dr. Especialisata en Cirugia Oncologica INCAN**  
\*\*\*\* **Dr. En Ciencias.**  
\*\*\*\*\* **Licenciada en analisis químico biologico UAA.**  
\*\*\*\*\* **Dra. Especialidad Imagenologia diagnostica y terapêutica.**  
\*\*\*\*\* **Especialista en Histopatologia CHMH**  
\*\*\*\*\* **Especialista en Cirugia General. CHMH**  
\*\*\*\*\* **Especialista en Cirug. Oncologica y Maestro en Ciencias.CHMH**  
\*\*\*\*\* **Medico Residente de Cirugia General**  
\*\*\*\*\* **Medico Residente de Imagenologia diagnostica y terapeutica.**

### *AGRADECIMIENTOS*

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

*Inicio así como en algún tiempo hace cuatro años inicio mi especialidad, La presentación de mi tesis ES solo mas que un fragmento de tiempo que resumir, recuerdo La inmensa cantidad de enseñanzas y las palabras que a menudo me escuchaba decir, que día a día encontraba un sin número de cosas nuevas por descubrir, seque no lo He encontrado todo, pero tengo ansiedad de continuar mi camino y seguir descubriendo con El tiempo lo que me depara. Creo que soy afortunado por ponerme en el momento adecuado, en El lugar preciso para así formarme y ser La persona que soy. Cada regaño, cada desvelada, las levantadas temprano y las no dormidas llenan mi corazón y lo único que se me queda o que puedo recordar ES lo mejor. Empezando así quiero titular a este trabajo y El resumen de mi especialidad como La Cadena. Una cadena tiene de inicio un objetivo de guardia, de protección, de jalar de atar, pero un solo eslabón no podría cumplir con cada una de las metas por las que fue diseñada, siempre necesita de mas eslabones que unidos tiren o jalen de forma pareja y homogénea, La ruptura de uno de estos puede llegar a quebrantar El objetivo primordial. Así es La especialidad y en este caso en particular La tesis. Todas Las personas que me acompañaron en este camino son parte importante y como eslabón formaron esta cadena, sin El apoyo de cada uno de las personas que estuvieron cerca, AL pendiente no se hubiera logrado lo que hoy con gran gusto y aprecio digo gracias a cada uno de los eslabones de mi vida.*

*DEDICO A MI FAMILIA MI ESPECIALIDAD Y ESTA TESIS.*

*ELIAN MI ANGEL: Llegaste a mi vida en un momento tan justo. Llenaste todas mis mañanas de alegría pensando en que al termino de este, te podría ver. No se si he sido un buen padre , pero tu has sido un gran hijo, no puedo describirte con palabras lo hermoso que eres, verte crecer y ver que a tu edad vas rompiendo cada obstáculo que se te presenta. Te has vuelto mi inspiración siempre vere por ti, luchare por ti. Siempre juntos mi Angel Bello, Siempre juntos Mi Elian.*

*AMORE. Amor gracias por estar a mi lado, por creer en mí, por darme apoyo incondicional, por aguantar las desveladas y sobre todo por darme tanto amor y hacer que mi corazón te ame con tanta fuerza, por darme tu tiempo y entender mi Carrera, Por ser quien me escucha atentamente cada día y noche y a La única persona que quiero escuchar cuando empieza y termina mi día. Por La gran persona que eres, siempre mi corazón feliz y positiva por irradiarme siempre tu felicidad gracias mi esposa hermosa*

*A MIS PADRES: Las personas más importantes de mi vida y cuales amo con toda mi fuerza, agradezco cada uno de los innumerables veces que me han apoyado, estoy tan orgulloso de ser su hijo y tan agradecido por haberme dado lo necesario para llegar hasta aquí, los He extrañado mucho todo este tiempo pero ha valido La pena porque a pesar de La distancia estamos siempre juntos.*

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

*A MI PA* gracias por siempre enseñarme *El* no rendirme, *El* ser fuerte y no quebrantar, gracias *fa* por estar siempre a mi lado todo este tiempo, por apoyarme siempre al máximo y sobre todo por ser *El* padre que eres. Guerrero imparable de mil batallas, me has enseñado a caer y levantarme. mil gracias por ser tu quién me da fortaleza. *Fa* eres mi más grande ejemplo a seguir.

*MADRE* Gracias a ti soy lo que soy, soñadora incansable gracias por los mil consejos recibidos, gracias por siempre darme tu hombro cuando lo necesite a ti mi madre *La* persona más preciada que tengo, gracias por tus palabras dulces o tu preocupación persistente que enriquece mis días. Sin ti esto no hubiera sido posible te adoro con todo mi corazón estoy tan orgulloso de que estés a mi lado.

*A MIS HERMANOS:* antes que hermanos somos los más grandes amigos, gracias a todos. Siempre los *He* admirado son mi ejemplo a seguir y claro algo siempre que presumir, pero sobre todo que siempre estamos juntos en las buenas y en las malas los adoro con toda *El* alma y eso *ES* muchísimo porque los cuatro somos una misma. Sin uno no somos nada

*MAN* cada día que pasa me muestras algo nuevo y diferente, me enriqueces cada palabra que sale de tu boca, eres un roble que siempre me ha cobijado y ha creído inmensamente en mí, siempre juntos, gracias por cada consejo y apoyo tuyo sin ellos no sería lo mismo no estaría aquí te adoro con todo mi corazón.

*DAGOR:* Estoy tan orgulloso de tenerte como mi hermana, tu siempre muestras una sonrisa eres *La* más optimista, aunque no todo este tan bien siempre me lo hiciste creer, gracias por tus palabras y *El* tiempo a mi lado tu corazón siempre esta tan lleno de amor gracias *gordonfla* por todo lo que me has apoyado te quiero en lo más profundo de mi alma.

*JANA:* Sabes eres mi flor *La* concen, gracias corazón por formar parte de mí, siempre te protegeré y estaré *AL* pendiente de ti, estoy orgulloso de todo lo que has alcanzado y lo que tienes dentro de ese inmenso corazón, de tu palabras dulces y payasadas que me hacen reír y que extraño cuando no estás te quiero muchísimo *Janita* siempre juntos.

*GABRI.* Eres mi Nuevo Hermano, gracias por formar parte de esta familia me has dado tranquilidad y consejos de gran peso, gracias por tu optimismo y por creer en mí eres también un gran ejemplo a seguir.

*CHALLO Y CHALLITO:* Por darme todo *El* apoyo que necesitaba por darme su tiempo a pesar de que *ES* tan valioso por compartir muchas cosas excelentes por *La* inmensa enseñanza que me dejó *El* breve lapso y por mostrarme las magnificas personas que son muchísimas gracias.

*DR FROYLAN* muchas gracias por todo *El* apoyo incondicional que me dio porque nunca dudó en mí y así me lo demostró, gracias por ser un excelente oncólogo pero sobre todo una gran persona.

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

*DRA BLANCA SEGURA Gracias por todo el apoyo que me dio, por creer en esto y brindarme los medios necesarios para obtenerlo, poca gente así como ud con todo corazón muchas gracias.*

*A MIS MAESTROS: Quiero a agradecer a todos mis maestros en cirugía por dedicar cada momento de mi formación como cirujano oncólogo y mostrarme cada cosa que ahora se. Todos son excelentes como cirujanos pero sobre todo como personas, no solo aprendí a operar me dieron La capacidad de crecer más, conocer más de mi y de creer en mí por eso mil gracias.*

*A cada uno de mis maestros Le confiero una gran admiración y estima que siempre estará en mí, y de sentirme orgulloso de ser alumno de ustedes. Especial Agradecimiento a mi gran Maestro Dr Parra , El gran Maestro Dr.- Alcala, a mi gran maestro Dr Angel Herrera a mis grandes maestros Dr. Muñoz, Dr. Padilla, Dr Martinez Said. Dr Isala, Dra salcedo, Dr Montalvo, Dr Ruiz Molina , Dr. Jimenez, Dr Corona, Dr Cuellar, Dr Robles. Dr. Granados, Dr Luna, Dr. Gomez, Dr. Lopez Basave, Dra Vela, Dr Melchor, Dr Martinez, Dr Jimenez, Dr Solares, Dra Villareal, Dr Corona, Dr Jimenez, Dr Gonzalez, Dr Carrillo, Dr Cantu, Dr Ochoa, Dra Robin, Dr Solorza.*

*Quiero agradecer a todos mis compañeros residentes y a mis AMIGOS, solo El que está dentro sabe definir y conoce esto por todo lo vivido, por las muchas alegrías y enojos por todo El apoyo que obtuve . vivimos momentos difíciles y los pudiera definir por años. El Primer año conocimos mas de nosotros llegamos al limite de todo lo que se había vivido antes, Fue duro, pesado. Sin embargo siempre estaban ustedes, para brindar apoyo incondicional. Salimos juntos gracias a una gran fortaleza que nos forjo pero sobre todo a la gran AMISTAD que nos unio. Ahora veo que todos nos hemos transformado y me da muchísimo gusto verlos en quirófano y sus pacientes como todos unos cirujanos oncólogos , el tiempo es sabio y el trabajo da los frutos los quiero de verdad Amigos Agradezco de todo corazón el haber estado juntos mis grandes amigos y hermanos Ernesto Molina, Denis Espinoza, Horacio vidrio, Antonio Posada, Jaime Corona, Pablo Herrero, Sandra Fajardo.*

*Muere lentamente quien no viaja,  
quien no lee, quien no escucha música,  
quien no halla encanto en sí mismo.  
Muere lentamente quien destruye su amor propio;  
quien no se deja ayudar.  
Muere lentamente  
quien se transforma en esclavo del hábito  
repetiendo todos los días los mismos senderos,  
quien no cambia de rutina,  
no se arriesga a vestir un nuevo color  
o no conversa con quien desconoce.  
Muere lentamente quien evita una pasión  
y su remolino de emociones,  
aquellas que rescatan el brillo de los ojos  
y los corazones decaídos.  
Muere lentamente  
quien no cambia su vida cuando está insatisfecho  
con su trabajo o su amor,  
quien no arriesga lo seguro por lo incierto  
para ir detrás de un sueño, quien no se permite  
al menos una vez en la vida huir de los consejos sensatos...  
¡Vive hoy!  
¡Arriesga hoy!  
¡Haz hoy!  
¡No te dejes morir lentamente!  
¡No te olvides de ser feliz!*

PABLO NERUDA



## RESUMEN

**Introducción:** La carcinomatosis peritoneal constituye el estadio terminal de tumores malignos intra y extrabdominales con elevada mortalidad. El tratamiento actual estándar es a base de quimioterapia intravenosa con diferentes fármacos quimioterapéuticos cuya elección depende de la histología y del tumor primario pero con escaso o nulo beneficio en la sobrevida y cuyo objetivo primordial es la paliación de la sintomatología. En los últimos años se ha desarrollado una técnica que consiste en la resección de las lesiones tumorales macroscópicas del peritoneo parietal y visceral (peritonectomía) combinada con la perfusión intraoperatoria de la cavidad abdominal con agentes quimioterápicos calientes para tratar las lesiones microscópicas residuales con una supervivencia que pueden llegar hasta el 80% a los cinco años, de acuerdo a la estirpe tumoral. Poco se sabe de la respuesta tumoral de estos pacientes con la aplicación por perfusión de inhibidores de la angiogenesis y la respuesta clínica de los pacientes a dichos medicamentos.

**Objetivo:** Demostrar las diferencias en los manejos en ratones nude con carcinomatosis peritoneal implantados con células de cáncer de colon, comparando la quimioterapia hipertérmica con 5FU, bevacizumab e hipertermia; todos intraperitoneal perioperatoria. Demostrar los cambios clínicos, histológicos, tumoral, la expresión de FCEV y sobrevida.

**Material y Métodos:** Estudio experimental, prospectivo, comparativo, transversal, descriptivo y analítico. Se utilizaron ratones desnudos homocigóticos, hembras, con un peso entre 20- 25gr y edad de 8 semanas de edad; implantados intraperitonealmente con células SWIP2 de cáncer de colon, provocando carcinomatosis. Se formaron 4 grupos con 4 ratones cada uno: El primer grupo fue el control, segundo grupo perfusión de soluciones hipertérmicas sin medicamento. Tercer grupo Perfusión de quimioterapia hipertérmica con 5-Fluoruracilo. Cuarto grupo aplicación de perfusión intraperitoneal con Bevacizumab. Los ratones fueron manejados de acuerdo a la NOM-062-200-1999. Se instaló sistema de perfusión a 2 ml/min. La anestesia se realizó con ZOLETIL \*50 intramuscular a dosis de 5mg/kg. La técnica quirúrgica consistió en un abordaje por línea media abdominal de 1.5 cm, se refirieron e identificación lesiones y toma de biopsia extracción de liquido de ascitis, posterior se realiza técnica de coliseo y perfusión continua de soluciones dependientes del grupo; por 25 minutos a una temperatura de 41-43°C continuo, con monitorización de temperatura y signos vitales; posterior a perfusión se realizó secado de la cavidad peritoneal y cierre de la pared abdominal en 2 planos. Se reinició la vía oral a los 40 minutos, observamos la ingesta de alimentos la actividad física y se mide la sobrevida por cada grupo, se realiza autopsia e histopatológico de órganos para ver la infiltración a órganos así como inmunohistoquímica de los tumores para ver el grado de expresión de VEGF.

**Resultados:** los resultados en el cultivo celular fue satisfactorio teniendo un índice de implantación en ratones nude del 100%, en los grupos estudiados hay un aumento en

la actividad física la ingesta de alimentos, así como un aumento en la sobrevida del grupo manejado con bevacizumab P 0.031, así con disminución de la infiltración a órganos abdominales en el grupo manejado con bevacizumab, 5 fluorouracilo en comparación con el grupo control, se encuentra una expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular en los tumores por carcinomatosis.

**Conclusiones:** El manejo con Bevacizumab en este estudio aumento significativamente la sobrevida, así como mejoró las condiciones clínicas de los ratones nude con carcinomatosis peritoneal, siendo que no es un medicamento que se utilice en los esquemas actuales de tratamiento intraperitoneal, es importante realizar más estudios para valorar la respuesta patogénica en pacientes. Con posibles resultados muy prometedores.

Se comprobó la sobreexpresión de los receptores para el VEGF en los ratones nude con carcinomas peritoneal por cáncer de colon y su probable correlación clínica al bloqueo a estos receptores por el grupo manejado con bevacizumab. Con ello disminuyendo el tamaño del tumor así como la disminución de la cantidad de líquido de ascitis y por consiguiente el aumento en la sobrevida.

**INDICE DE CONTENIDOS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCION.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 CARCINOMATOSIS PERITONEAL.</b>                                       |           |
| 1.1 Generalidades de La carcinomatosis peritoneal.....                      | 3         |
| 1.2 Mecanismos de implantación tumoral peritoneal.....                      | 5         |
| 1.3 Bases Del Tratamiento.....  | 7         |
| 1.3.1 Cirurgia Radical. ....  | 8         |
| 1.3.2 Quimioterapia Intraperitoneal perioperatoria.....                     | 11        |
| 1.3.3 Hipertermia.....  | 12        |
| 1.3.4 Criterios de inclusión y exclusión para pacientes.....                | 15        |
| 1.4 Medicamentos utilizados en La quimioterapia y La terapia biológica..... | 16        |
| 1.4.1 Agentes citostáticos.....   | 16        |
| 1.4.2 5- Flurouracilo. ....   | 21        |
| 1.4.3 Bevacizumab.....  | 23        |
| <b>2 Neovascularizacion.....</b>  | <b>26</b> |
| 2.1 Vasculogenesis.....   | 27        |
| 2.2 Arteriogenesis.....   | 27        |
| 2.3 Angiogenesis.....   | 27        |
| 2.3.1 Proceso angiogenico.....  | 28        |
| 2.3.2 Enfermedades angiogenesis dependientes.....                           | 29        |
| 2.3.3 Factores estimuladores e inhibidores de La angiogenesis.....          | 30        |
| 2.3.4 Enfermedades asociadas a um exceso de angiogenesis.....               | 30        |
| 2.4 Factores de crecimiento de La familia del VEGF. ....                    | 31        |
| 2.4.1 Regulacion del La expresion del gen del VEGF ....                     | 32        |
| 2.4.2 Receptores Del VEGF.....  | 33        |
| 2.4.3 Transduccion de señales.....  | 34        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.4 Actividad biológica.....   | 36        |
| 2.5 Angiogenesis em La ascitis maligna.....                            | 36        |
| 2.6 Manejo en la inhibicion de la actividad del VEGF en la carcin..... | 40        |
| 2.6.1 Inhib. del VEGF em um anticuerpo monoclonal Bevacizumab.....     | 41        |
| <b>3. Ratones Desnudos Atimicos. ....</b>                              | <b>42</b> |
| 3.1 Ratones desnudos en estúdios ontológicos.....                      | 44        |
| 3.2 Sistemas de cria.....  | 44        |
| 4. Celulas SW480.....  | 45        |
| 5. Planteamiento del problema.....                                     | 46        |
| 6. Justificacion.....  | 46        |
| 7. Hipotesis nula.....   | 47        |
| 8. Hipotesis alterna.....  | 47        |
| 9. Objetivo General.....   | 47        |
| 9.1 Objetivos específicos.....   | 47        |
| 10. Tipo de estudio.....   | 48        |
| 11. Definicion del universo.....                                       | 48        |
| 12. Criterios.....   | 48        |
| 12.1 Criterios de inclusion. ....                                      | 48        |
| 12.2 Criterios de eliminacion.....                                     | 48        |
| 13. Seleccin de la muestra.....  | 49        |
| 14. Variables.....   | 49        |
| 14.1 Variables independientes.....                                     | 49        |
| 14.2 Variables dependientes.....                                       | 49        |
| <b>15. MATERIALES Y METODOS.....</b>                                   | <b>50</b> |
| 15.1. mantenimiento y cuidados de ratones nude.....                    | 51        |
| 15.2 Biotério.....   | 52        |
| 15.2.1 antecedentes del biotério.....                                  | 52        |
| 15.2.2 Esterilizacin Del biotério.....                                 | 52        |
| 15.3 Cultivos celulares laboratório de La UAA.....                     | 53        |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 15.3.1   | Células SWIP2.....  | 53 |
| 15.3.2   | Antecedentes células SWIP2 .....  | 53 |
| 15.3.3   | Método de descongelación de vial con células SWIP2.....                                   | 54 |
| 15.3.4   | Cultivo y Propagación de células SWIP2 .....  | 57 |
| 15.3.5   | Procedimiento de Despegamiento y cambio de cultivo y<br>Caja de células SWIP2 mutada..... | 57 |
| 15.3.6   | Seguimiento de cultivo celular, viabilidad y conteo.....                                  | 61 |
| 15.3.7   | Protocolo de colocación de células SWIP2 en<br>Jeringas para inoculación.....             | 62 |
| 15.4     | Implantación Intraperitoneal y seguimiento.....   | 62 |
| 15.5     | Método de seguimiento en bioterio.....  | 63 |
| 15.6     | Grupos de Estudio.....  | 64 |
| 15.6.1   | Grupo carcinomatosis peritoneal Control.....  | 64 |
| 15.6.2   | Grupo Carcin. peritoneal tratada con hipertermia.....                                     | 65 |
| 15.6.3   | Grupo Carcin. peritoneal trat. con hipertermia con 5-FU.....                              | 65 |
| 15.6.4   | Grupo Carcin. peritoneal tratada con bevacizumab.....                                     | 65 |
| 15.7     | Procedimiento quirurgico.....   | 65 |
| 15.7.1   | equipo utilizado.....   | 66 |
| 15.7.2   | preparación de medicamentos y diluciones. ....  | 66 |
| 15.7.3   | regulación de temperatura para hipertermia.....   | 67 |
| 15.7.4   | Programación de flujos.....   | 67 |
| 15.7.5   | Zoletil como anestésico.....  | 68 |
| 15.7.5.1 | Técnica anestésica.....   | 69 |
| 15.7.5.2 | Farmacocinetica en el ratón desnudo. ....   | 69 |
| 15.8     | Técnica<br>quirúrgica.....  | 69 |
| 15.9     | Medidas de seguimiento y valoración clínica postquirurgico.....                           | 74 |
| 15.10    | Resonancia Magnética Nuclear.....   | 75 |
| 15.11    | Análisis estadístico.....   | 76 |

|              |                          |            |
|--------------|--------------------------|------------|
| <b>15.12</b> | <b>Histología.....</b>   | <b>76</b>  |
| <b>16.</b>   | <b>resultados.....</b>   | <b>77</b>  |
| <b>17.</b>   | <b>discusión.....</b>    | <b>103</b> |
| <b>18.</b>   | <b>Conclusiones.....</b> | <b>109</b> |
| <b>19.</b>   | <b>bibliografía.....</b> | <b>111</b> |

## 1. INTRODUCCION

El tratamiento con quimioterapia sistémica no ha tenido éxito en el pasado y el cirujano cuando se enfrenta a la carcinomatosis peritoneal por cáncer de colon, apéndice o por recurrencias de cánceres ginecológicos elige el procedimiento paliativo más simple o solo se limita a una toma de biopsia y cierra la herida quirúrgica, condenando al paciente a la espera de su fallecimiento; remover limitadas cantidades de carcinomatosis resulta inútil y frecuentemente conduce a una progresión rápida. Esto ha cambiado con el advenimiento de la citorreducción máxima la cuál ya ha sido probada en cáncer de ovario<sup>2</sup>.

La cirugía citorreductora combinada con la quimioterapia intraperitoneal con hipertermia (HIPEC) surge como una opción de tratamiento para pacientes con carcinomatosis peritoneal. Aún no hay una metodología estandarizada para el procedimiento y varía de institución a institución; sin embargo, se ha logrado tener puntos de acuerdo tales como citorreducción completa antes de la quimioterapia intraperitoneal, temperatura, duración de la perfusión, técnica abierta o cerrada<sup>1,2</sup>.

La carcinomatosis peritoneal constituye el estadio Terminal de algunos tumores malignos intra y extraabdominales, que presentan una elevada mortalidad con los tratamientos habituales y supervivencias medias que alcanzan en el mejor de los casos seis meses. En los últimos años se viene desarrollando una técnica que consiste en la resección de las lesiones tumorales macroscópicas del peritoneo parietal y visceral (peritonectomía) combinada con la perfusión intra y postoperatoria de la cavidad abdominal con agentes quimioterápicos calientes para tratar las lesiones microscópicas residuales, habiéndose descrito supervivencias que pueden llegar hasta el 80% a los cinco años, según la estirpe tumoral. La diseminación peritoneal constituye uno de los principales patrones de recaída tras cirugía en los tumores de localización abdominal y pélvica. Ha sido considerada clásicamente como un signo de enfermedad generalizada, tratada de forma paliativa y de desenlace inevitablemente fatal. En un reciente estudio multicéntrico en el que se incluían pacientes con carcinomatosis de origen no ginecológico, la supervivencia media era de 3.1 meses<sup>3</sup>. En estudios en los que se ha tratado con quimioterapia sistémica, se han obtenido buenas respuestas tumorales, aunque sin mejoría en la supervivencia.<sup>4</sup>

La diseminación de las células tumorales en el peritoneo puede ser espontánea a producirse durante la cirugía, por mecanismos como la formación de émbolos tumorales por la presión, la fuga de células malignas al cortar los vasos linfáticos o la siembra de las mismas en la cavidad peritoneal durante la disección quirúrgica. Va seguida habitualmente de la invasión o perforación de la serosa. Una vez extirpado el tumor primario, los factores de crecimiento celular involucrados en la cicatrización estimulan el crecimiento de las células malignas viables atrapadas o en coágulos sanguíneos intrabdominales, o por la fibrina en superficies peritoneales traumatizadas. Paralelamente, el atropamiento de dichas células dificulta el acceso a ellas de la quimioterapia sistémica, disminuyendo o anulando su eficacia.

Desde 1980 han aparecido en la literatura nuevas propuestas para el tratamiento de los pacientes afectados de diseminación tumoral peritoneal, un grupo de difícil manejo terapéutico y emocional, derivado de la perspectiva de fracaso terapéutico con pérdida rápida y progresiva de la calidad de vida. La administración

de drogas antitumorales por vía intraperitoneal, la inmunoterapia intracavitaria, la terapia foto dinámica o la quimioterapia e hipertermia intraperitoneal constituye una muestra de las líneas de trabajo en esta dirección. La perfusión intraperitoneal con quimioterapia e hipertermia ha ofrecido hasta el momento resultados esperanzadores. Consiste en realizar la cirugía de exéresis máxima o debulking, seguida de dosis altas de quimioterapia regional en perfusión hipertermica durante el mismo acto operatorio. En ocasiones se completa la técnica con la administración de dosis altas de quimioterapia en la cavidad peritoneal los días posteriores a la cirugía, a través de catéteres provisionales implantados a tal efecto<sup>4,5,6</sup>.

La cirugía posibilita la reducción de la enfermedad peritoneal a un tamaño mínimo y libera todas las adherencias, creando las condiciones optimas para obtener mayor eficacia de los citostáticos. Estos son potenciados por el calor, que también tiene un efecto citotóxico por si mismo, se elimina el atrapamiento celular, y se consiguen niveles altos de fármaco en la zona a tratar, imposibles de lograr por vía sistémica debida a su toxicidad. Debido a la barrera peritoneo-plasmática, las sustancias de alto peso molecular como mitomicina C, 5-fluoracilo, cisplatino o doxorubicina, permanecen largo tiempo dentro del abdomen antes de su eliminación a través de la sangre, lo que las hace especialmente indicadas en esta modalidad terapéutica. El interés por la quimioterapia intraperitoneal no es nuevo. Ya en 1955, Weissberger et al recogieron los resultados del tratamiento de 7 pacientes con cáncer de ovario que recibieron quimioterapia intraperitoneal con mostaza nitrogenada.

Los principales estudios farmacocineticos fueron realizados por dedrick et al en 1978, y en ellos encontraron que los fármacos citostaticos hidrófilos pueden mantener un gradiente de concentración significativo por la barrera peritoneo-plasmática cuando se añaden en la cavidad abdominal en grandes volúmenes. Sin embargo, también en sus estudios demostraron que el factor limitado más importante para el uso clínico de la quimioterapia intraperitoneal era la escasa penetración de los fármacos utilizados en los tejidos tumorales. En la actualidad se cree que la difusión de los citostaticos es máxima en 1-3 mm en la periferia del tumor.

Por estos motivos, en la actualidad se acepta, en general, que solo los pacientes con enfermedad residual mínima después de la cirugía pueden beneficiarse de la quimioterapia intraperitoneal. A menudo no es posible extirpar por completo la enfermedad tumoral microscópica. La mayoría de los grupos considera que la quimioterapia intraperitoneal solo es útil si los nódulos residuales tumores son <3 mm. La administración de quimioterapia intraperitoneal tiene el beneficio de proporcionar concentraciones más altas de citostaticos en el lugar donde se encuentra el tumor, a la vez que se minimizan los efectos tóxicos sistémicos en comparación con los producidos por la administración intravenosa sistémica .

La quimioterapia intraperitoneal en el tratamiento y prevención de las enfermedades peritoneales fue introducida en los comienzos de la cadena de los ochenta . Ya Sugarbaker aconsejaba la utilización de quimioterapia intraperitoneal en los canceres avanzados colorrectales en 1985. Gilly et al aportaron la primera experiencia en Europa siguiendo la escuela de fujimoto et al y Koga et al<sup>12,13</sup>.

Básicamente, el grupo occidental liberado por sugarbaker se superespecializo en carcinomatosis colorrectal y pseudomixoma peritoneal, mientras

que los investigadores orientales liberados por Yonemura lo hicieron en carcinomatosis gástrica.

Tres son las causas por las que la utilización de la quimioterapia intraperitoneal ha tenido éxito limitado y escasa aceptación por los oncólogos:

- La limitada penetración de los fármacos en nódulos tumorales. Los citostáticos solo penetran en las capas celulares más externas, lo que obliga a que la enfermedad microscópica residual sea la enfermedad diana para los protocolos de este tipo de tratamiento.
- La falta de distribución uniforme de los citostáticos en la cavidad abdominal por las adherencias y la presencia de un tumor de gran volumen.
- La elección inadecuada de los pacientes<sup>7,8</sup>.

En la actualidad se ha producido un importante cambio en la utilización de la quimioterapia. Se ha modificado la ruta de administración, y ahora la quimioterapia se administra intraperitonealmente, por lo que actúa donde la enfermedad está. También se produce un cambio en el tiempo, dado que la quimioterapia comienza a administrarse en el mismo quirófano intraoperatoriamente, justo tras finalizar la extirpación citorreductora de la enfermedad microscópica residual. Por último, un tercer cambio se produce en los criterios de selección de los enfermos candidatos a este tratamiento, al ser necesaria una citorreducción completa de la enfermedad antes de la administración de los citostáticos, por lo que el tamaño de los implantes residuales tienen una importancia crucial<sup>3,4,5</sup>.

El mayor cambio está por producirse, y será el cambio de actitud de los oncólogos hacia el tratamiento de la enfermedad avanzada colorectal. La carcinomatosis peritoneal es potencialmente curable con la aplicación precoz de este nuevo tratamiento combinado<sup>10,12</sup>.

### **1.1 CARCINOMATOSIS PERITONEAL.**

#### **GENERALIDADES DE LA CARCINOMATOSIS PERITONEAL.**

Tumores primarios del peritoneo y carcinomatosis peritoneal secundaria. Pronóstico con los tratamientos habituales. La carcinomatosis peritoneal (CP) es la diseminación a nivel intraabdominal de los cánceres gastrointestinales, ginecológicos y de otros tumores, con o sin evidencia de otra expresión tumoral metastásica<sup>1</sup>. La carcinomatosis peritoneal puede ser de origen primario (mesotelioma peritoneal, carcinoma seroso peritoneal, psammocarcinomas, tumores desmoplásticos) o secundaria a tumores originados en colon y recto, ovario, estómago, a pseudomixoma peritoneal, a sarcomas abdominales, etc. El término CP fue utilizado por primera vez por Simpson en 1931 para describir la diseminación regional peritoneal de una paciente afectada de una neoplasia avanzada de ovario. Se manifiesta por la presencia

en la serosa peritoneal de nódulos tumorales de tamaño y distribución variable, asociados o no a la infiltración tumoral de las estructuras anatómicas vecinas. La incidencia de la CP es difícil de establecer dadas las limitaciones de las actuales determinaciones biológicas y medios de diagnóstico por la imagen. La ecografía y la tomografía axial computarizada (TC) son sensibles para diagnosticar la ascitis, pero los implantes menores de 2 cm (ecografía) y de 5 mm (TC) son difícilmente identificables mediante estas técnicas. La laparoscopia con la realización de biopsias parece ser el método más efectivo para diagnosticar la CP, pero comporta un riesgo de extender la diseminación peritoneal. La incidencia de la CP está relacionada con el origen del tumor primario. Los tumores originados de forma primaria en el peritoneo tienen una incidencia baja. En el cáncer epitelial de ovario la diseminación peritoneal está presente en el momento del diagnóstico de la enfermedad en el 70%-75% de las pacientes<sup>5, 6</sup>. En el cáncer colorrectal la CP se detecta coincidiendo con el diagnóstico del tumor primario en el 10% de los pacientes. El 40%-70% de los pacientes tratados de cáncer colorrectal presentan una recidiva en una o varias localizaciones y en el 10%-35% de estos pacientes esta recidiva se localizará de forma exclusiva en el peritoneo. En el cáncer gástrico la CP suele ser frecuente, incluso en las fases iniciales de la enfermedad. La diseminación peritoneal puede estar presente en el 15%- 50% de los pacientes, especialmente en aquellos que son intervenidos por tumores gástricos que infiltran la serosa. Los tumores originados de forma primaria en el peritoneo tienen una incidencia baja. Se calcula que en Estados Unidos se diagnostican anualmente 2.500 nuevos casos de mesoteliomas peritoneales difusos, de los que un 10%-20% son malignos. El pseudomixoma peritoneal es una entidad poco frecuente, con una incidencia aproximada anual de un caso por millón de habitantes. En la mayoría de los casos esta manifestación tumoral peritoneal es secundaria a la perforación de tumores epiteliales del apéndice, aunque también están descritos otros orígenes de pseudomixoma peritoneal. Los sarcomas son tumores poco frecuentes (2-3 casos por cada 100.000 habitantes/año). Sólo el 30% de los sarcomas tienen un crecimiento abdominal, y un porcentaje escaso de éstos metastatizan de forma exclusiva en el peritoneo,<sup>32, 34, 35</sup>.

La CP suele manifestarse de forma muy diversa, desde la presencia de escasos implantes milimétricos en la superficie del peritoneo adyacente al tumor primario, hasta la ocupación de todo el abdomen y la pelvis por masas voluminosas de tumor que infiltran cualquier órgano y estructura anatómica. En el momento del diagnóstico de la CP, el tamaño y la extensión de la enfermedad peritoneal (volumen de la CP) no influyen en la definición del término. El volumen de la CP se relaciona con la supervivencia mediana de los pacientes tratados mediante quimioterapia sistémica. La evolución natural y la respuesta a los tratamientos quimioterápicos sistémicos de la CP son diferentes a los de la enfermedad metastásica de localización hepática o pulmonar. El pronóstico de los pacientes con CP es peor que en las metástasis hepáticas o pulmonares. La CP se ha considerado como una situación dramática en la evolución de cualquier neoplasia y siempre ha estado asociada a mal pronóstico, incurabilidad o enfermedad terminal. La mayoría de los pacientes con CP evolucionan hacia la obstrucción intestinal, la formación de ascitis, la caquexia tumoral o la combinación de todos estos síntomas. Los pacientes suelen fallecer en un estadio de deterioro importante de su calidad de vida. En el cáncer colorrectal, cerca

del 85% de los pacientes que desarrollan CP fallecen con la enfermedad tumoral confinada al abdomen. Hasta ahora, el tratamiento considerado como estándar en la CP es la quimioterapia sistémica y/o la cirugía. La indicación de estos tratamientos es de índole paliativa y dirigida al control de los síntomas y de las complicaciones<sup>32,46</sup>.

La cirugía de reducción de masa tumoral (*debulking*) sola va asociada, en todas las situaciones en que se realiza, a una recidiva peritoneal precoz, 20 informes, estudios e investigación aunque la CP sea de extensión localizada o limitada y pueda ser extirpada por completo durante la cirugía. La quimioterapia intraperitoneal, también administrada de forma aislada, sin cirugía radical previa, no tiene impacto positivo sobre la supervivencia de estos pacientes. Varios estudios prospectivos realizados antes del año 2002 en pacientes con carcinomatosis peritoneal de origen colorrectal mostraron supervivencias medianas de 5 a 9 meses con el tratamiento quimioterápico. El estudio prospectivo y multicéntrico EVOCAPE 1 incluyó a pacientes afectados de carcinomatosis peritoneal de origen gástrico, colorrectal y pancreático, tratados con cirugía paliativa y/o quimioterapia sistémica. Los pacientes se reagruparon por estadios dependientes del tamaño del tumor peritoneal. La supervivencia mediana de los pacientes de este estudio estuvo relacionada con el tumor primario, siendo de 3,1, 5,2 y 2,1 meses, respectivamente. Cabe tener en cuenta que, en el subgrupo de la CP de origen colorrectal, el 60% de los pacientes presentaban nódulos inferiores a 20 mm, y aun así la supervivencia en estos pacientes fue muy limitada.<sup>2,3,4</sup>

Protocolos más actuales de quimioterapia sistémica que contemplan fármacos como el oxaliplatino o el irinotecán, solos o en asociación con otros tratamientos biológicos, pueden prolongar esta supervivencia a 21,5-24 meses. Sin embargo, estos estudios han sido realizados con grupos de pacientes que presentaban cualquier tipo de manifestación metastásica de cáncer colorrectal, ya fuera única o múltiple. Es raro encontrar supervivientes a los 5 años con este tipo de tratamiento.<sup>5,6</sup>

### **1.2 MECANISMOS DE IMPLANTACIÓN TUMORAL PERITONEAL.**

La diseminación peritoneal es una vía muy importante de extensión de los tumores digestivos y ginecológicos también utilizada, con menor frecuencia, en tumores de otras localizaciones. La particular ultraestructura de gran parte del peritoneo facilita la diseminación metastásica de las células neoplásicas presentes en la cavidad abdominal, incluso en aquellos tumores con escasa agresividad biológica. Los mecanismos descritos en el desarrollo de la CP son múltiples y es probable que este proceso de diseminación tumoral tenga un origen causal multifactorial. Las células tumorales que infiltran la superficie serosa del tumor primario pueden desprenderse espontáneamente a la cavidad abdominal o bien distribuirse por esta cavidad debido a la perforación del tumor. La manipulación de un tumor durante la cirugía también puede facilitar este desprendimiento celular. Las células tumorales desprendidas circulan libremente y se difunden entre las estructuras del abdomen gracias a los movimientos hidrodinámicos relacionados con la respiración, la peristalsis intestinal y el efecto de la propia gravedad. La presencia de ascitis y las zonas de reabsorción activa como el eiplón facilitan la distribución del tumor en

todos los compartimentos del abdomen. La mayor concentración de tumor ocurre en aquellas estructuras anatómicas fijas como la región ileocecal y en regiones declives o de circulación de los fluidos peritoneales, como el saco de Douglas, las correderas parietocólicas, ambos hemidiafragmas, la fosa retrohepática y el epiplón mayor<sup>15,16,17</sup>.

Las células tumorales presentes en la cavidad abdominal poseen gran afinidad por implantarse en la matriz intercelular de la serosa peritoneal lesionada o en cualquier otra zona cruenta provocada por la cirugía. Este proceso de implantación tumoral es muy rápido; puede ocurrir en pocos minutos y está facilitado por el efecto de las integrinas, otras moléculas de adhesión celular, y la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de los fibroblastos (*fibroblast growth factor*, FGF), el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) y el transformador del crecimiento beta (*transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ), que favorecen el crecimiento y la proliferación de las células neoplásicas. Todas estas moléculas aparecen durante los mecanismos fisiológicos de cicatrización de los tejidos. La unión de las células tumorales con la matriz intercelular de los tejidos es muy intensa y es imposible de evitar mediante los lavados/arrastre con las soluciones habitualmente utilizadas durante la cirugía. Una vez las células tumorales están recubiertas de fibrina y de otros productos de presentación temprana que intervienen en los procesos de reparación de los tejidos, se convierten en “santuarios” donde las células pueden crecer y proliferar protegidas del entorno exterior. En esta fase inicial de desarrollo tumoral la red neoformativa vascular no está presente para permitir la llegada de los fármacos citotóxicos administrados por vía sistémica. Además, las adherencias tisulares ejercen un efecto protector o aislante sobre los microfocos tumorales, de manera que evitan el efecto citotóxico local que se esperaría por contacto con los quimioterápicos administrados por vía intraperitoneal. Una vez implantadas las células tumorales en la matriz intercelular, el desarrollo tumoral es inmediato a la cirugía e independiente de la radicalidad oncológica de ésta. El número de células tumorales que se requieren para desarrollar una implantación tumoral peritoneal es muy inferior al necesario para producir cualquier otro tipo de metastatización tumoral (hepática, pulmonar, etc.). Este fenómeno es conocido como “ineficiencia metastásica” y fue corroborado por estudios sobre animales que demuestran el mayor trofismo de algunas cepas tumorales por el peritoneo<sup>34,35</sup>.

En 1989, Sugarbaker se basó en estos conocimientos sobre los mecanismos de implantación y desarrollo de las células tumorales en el peritoneo y las zonas desperitonizadas para definir la CP como una manifestación tumoral de comportamiento inicial locorregional que puede permanecer estable en la cavidad abdominal durante períodos prolongados de tiempo antes de generalizarse y afectar a otros órganos distantes. El tiempo de permanencia del tumor limitado a la cavidad abdominal es variable y depende del origen del tumor primario, del tipo y de la diferenciación histológicas y de otros aspectos intrínsecamente relacionados con la biología del tumor. Hasta entonces, la CP era considerada como una enfermedad tumoral sistémica o diseminada de forma generalizada.<sup>34,29,28</sup>

### **1.3. BASES DEL TRATAMIENTO MULTIDISCIPLINAR: CITORREDUCCIÓN QUIRÚRGICA RADICAL COMBINADA CON QUIMIOTERAPIA INTRAPERITONEAL +/- HIPERTERMIA.**

A partir de estos mismos conocimientos sobre los mecanismos de implantación y diseminación tumoral peritoneal, el enfoque terapéutico de la CP presentó cambios importantes. Sugarbaker propuso un tratamiento de “intensificación terapéutica regional” basado en una cirugía de carácter radical dirigida a eliminar todo el tumor macroscópico localizado en la cavidad abdominal, seguida de la aplicación inmediata de quimioterapia regional intraperitoneal. Esta vía de administración de la quimioterapia actuaría erradicando la enfermedad mínima o microscópica residual a la cirugía. La quimioterapia intraperitoneal debería de aplicarse durante el período inmediato a la cirugía, entre el primero y el quinto día del postoperatorio, antes de la formación de los “santuarios” tumorales. Este tipo de quimioterapia intraperitoneal recibe el nombre de quimioterapia intraperitoneal postoperatoria inmediata (EPIC, siglas en inglés de *early postoperative intraperitoneal chemotherapy*). Más adelante, en un intento de reducir al máximo el atrapamiento y el bloqueo temprano de las células tumorales en las zonas desperitonizadas después de la cirugía, se propuso la aplicación de la quimioterapia intraperitoneal durante la cirugía tras la extirpación del tumor. La administración inmediata de quimioterapia intraperitoneal con el abdomen abierto consigue arrastrar la fibrina y los restos microscópicos celulares de la cavidad abdominal. Se trata de un baño de la cavidad abdominal mediante fármacos activos a nivel local que son distribuidos homogéneamente por el cirujano después del tiempo quirúrgico de exéresis tumoral<sup>35,36,37</sup>.

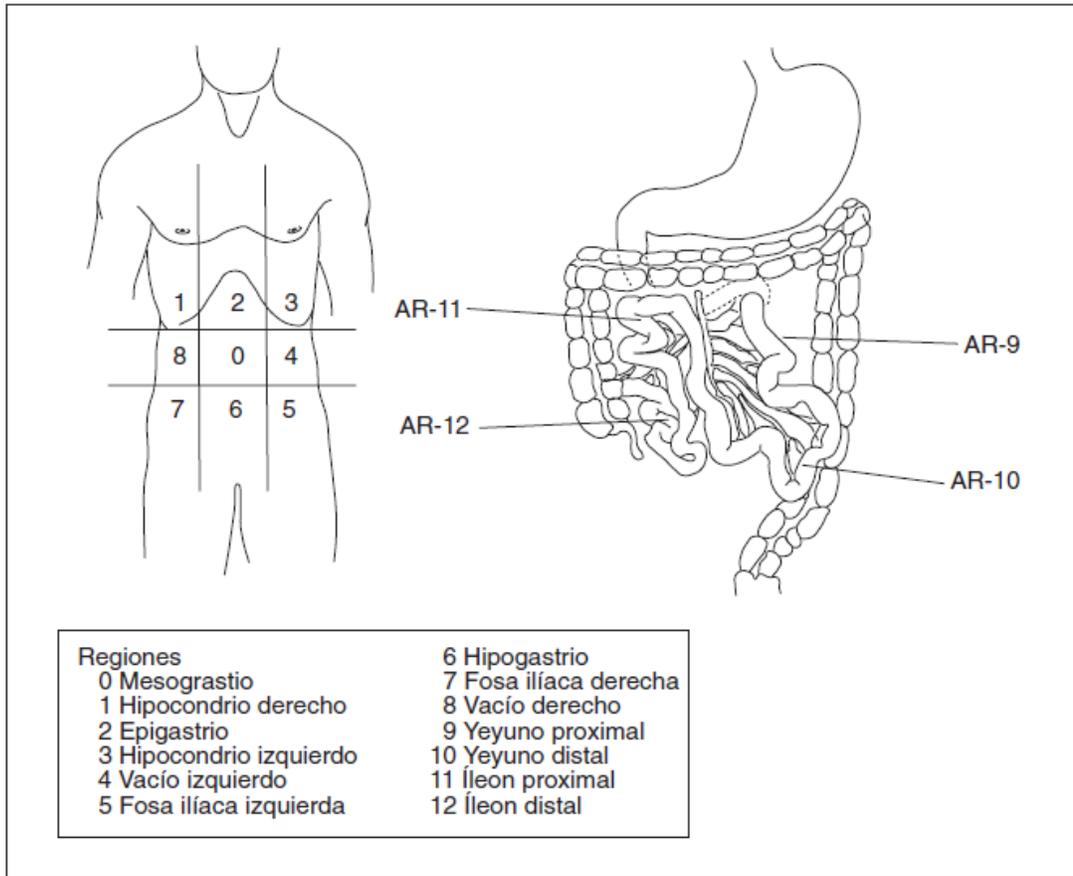
La asociación de la hipertermia a la quimioterapia intraperitoneal potencia el efecto terapéutico regional, induciendo un “shock tóxico” directo sobre las células tumorales. Este tipo de tratamiento regional recibe el nombre de quimiohipertermia peritoneal (HIPEC, del inglés *hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*), y fue utilizado por primera vez por Spratt para tratar a un paciente afectado de pseudomixoma peritoneal. Desde la década de 1990, este nuevo enfoque terapéutico combinado multidisciplinar de la CP, conocido también como tratamiento locorregional de la CP o procedimiento de Sugarbaker, se ha constituido en el único tratamiento radical y potencialmente curativo de algunos tipos de CP. El tratamiento multidisciplinar ha sido utilizado por centros especializados con algunas variaciones relacionadas con el tipo de fármacos quimioterápicos, el momento de aplicación de la quimioterapia intraperitoneal y la asociación con la hipertermia. Actualmente, en la mayoría de los centros dedicados al tratamiento de la CP, la HIPEC aparece como la modalidad de tratamiento quimioterápico regional más utilizada después de una cirugía radical. Elías comparó recientemente dos grupos de pacientes afectados de CP de origen colorrectal tratados mediante citorreducción completa. A un grupo le administró la EPIC y al otro la HIPEC. Los resultados del grupo que recibió HIPEC fueron significativamente mejores en términos de morbilidad, mortalidad y supervivencia, y la tasa de recidivas peritoneales fue el doble en el grupo que recibió la EPIC. El tratamiento multidisciplinar de la CP obliga al uso completo y adecuado

de los tres elementos que constituyen dicho tratamiento: 1) la cirugía radical; 2) la quimioterapia intraperitoneal simultánea a la cirugía, y 3) la potenciación del efecto de la quimioterapia intraperitoneal mediante la hipertermia. El tratamiento se ha de realizar a partir del uso estricto de cada uno de sus apartados<sup>19,20,21</sup>.

### 1.3.1 CIRUGIA RADICAL

El pronóstico de la CP está en relación con el tamaño de los implantes tumorales, su extensión y su distribución en el peritoneo (volumen tumoral peritoneal), y con su potencial resecabilidad quirúrgica. Se han descrito diferentes sistemas de clasificación del volumen de la enfermedad peritoneal. El más usado es el índice de cáncer peritoneal (ICP) establecido por el propio grupo de Sugarbaker. Este sistema determina una puntuación mínima de 0 y una máxima de 39, y ha demostrado ser un buen instrumento para clasificar la extensión de la carcinomatosis peritoneal, determinar la resecabilidad de ésta y ayudar a establecer el pronóstico de los pacientes.

El ICP fue considerado como el sistema más útil y fiable para clasificar el volumen de la CP en la reunión de consenso International Workshop of Peritoneal Surface Malignancy, realizada en Milán en 2006. El objetivo de la cirugía radical es la eliminación “completa” del tumor, es decir, lograr la ausencia de tumor macroscópico residual. Ante la imposibilidad de realizar este grado de citorreducción, también se acepta como cirugía radical aquella que consigue residuos tumorales mínimos, entendiendo como tales restos de tumor iguales o inferiores a 0,25 cm. Ocasionalmente, sólo en determinadas CP (pseudomixoma peritoneal, mesotelioma peritoneal) y siempre en presencia de tumores histológicamente bien diferenciados, puede ser aceptada una cirugía con restos tumorales de hasta 0,5 cm. El Completeness Cytoreductive Score (CCS) toma en consideración el tamaño del nódulo tumoral residual después de la cirugía, y establece que la citorreducción es completa cuando el resto tumoral no es visible (CC0) o es inferior a 0,25 cm (CC1); e incompleta cuando el tumor residual es de 0,25 a 2,5 cm (CC2) o superior a 2,5 cm (CC3). Este sistema CCS se ha considerado muy útil y adecuado para establecer el grado de radicalidad de la cirugía en las conferencias internacionales de consenso celebradas en el 2006 en Milán y en San Diego<sup>19,20</sup>.



El grado histológico del tumor es el otro factor pronóstico principal, identificado mediante análisis multivariable, relacionado con la supervivencia de los pacientes afectados de CP. Las mejores supervivencias a largo plazo con el tratamiento multidisciplinar se han logrado en los pacientes con la variante histológica tipo I de pseudomixoma peritoneal (adenomucinosi peritoneal) y en los que fue posible lograr una citorreducción quirúrgica completa<sup>21,22,26</sup>.

Los procedimientos de peritonectomías descritos por Sugarbaker son técnicas quirúrgicas que han demostrado ser útiles para conseguir la citorreducción quirúrgica completa en las CP. Estos procedimientos quirúrgicos persiguen eliminar el tumor macroscópico presente en el peritoneo parietal y visceral, además de la exéresis de las vísceras y estructuras infiltradas tumoralmente. Sólo se realiza la extirpación del peritoneo y de las estructuras cuando están visiblemente afectadas por el tumor. Se ha de preservar el peritoneo sano como elemento protector de la diseminación tumoral. Los procedimientos de peritonectomías constituyen hasta un total de seis pasos técnicos quirúrgicos que deben realizarse ordenada y secuencialmente, siempre dependiendo de la extensión y de la distribución de la CP<sup>29,33,35</sup>.

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

Cada procedimiento se define según las regiones y los órganos afectados por el tumor que requieran ser extirpados:

- 1) omentectomía mayor, peritonectomía parietal derecha +/- exéresis del colon derecho.
- 2) peritonectomía pélvica +/- exéresis rectosigmoidea +/- histerectomía total, salpingooforectomía bilateral con anastomosis inmediata colorrectal baja.
- 3) omentectomía menor con exéresis del ligamento hepatoduodenal +/- gastrectomía +/- colecistectomía.
- 4) peritonectomía del cuadrante superior derecho +/- exéresis de la cápsula de Glisson.
- 5) peritonectomía del cuadrante superior izquierdo +/- esplenectomía.
- 6) otras resecciones intestinales y de masas abdominopélvicas.

El tumor peritoneal suele concentrarse fundamentalmente en el espacio retrovesical, el saco de Douglas, las correderas parietocólicas, el espacio subhepático derecho y las zonas subdiafragmáticas posteriores. También en la trascavidad de los epiplones, el compartimento retrogástrico y el hilio esplénico, así como en las hojas mesentéricas de los segmentos intestinales más fijos y con menos movilidad peristáltica (ángulo duodenoyeyunal, íleon distal y colon sigmoide). Los procesos cicatriciales y las estructuras con escaso retorno venoso (sacos herniarios) presentan especial predisposición al crecimiento tumoral. Todos estos territorios anatómicos deben ser explorados rigurosamente por el cirujano. En este tipo de cirugía, una parte importante del tiempo quirúrgico está orientado a la detección y exposición de todos los focos de tumor presentes en la cavidad abdominal. La decisión de realizar la cirugía radical sólo se confirma después de la rigurosa exploración abdominal, la determinación del ICP y, fundamentalmente, tras asegurar las posibilidades técnicas de conseguir una citorreducción completa CC0-CC1.<sup>38,39</sup>

La extirpación de los implantes múltiples o muy extendidos por amplias zonas del peritoneo parietal se realiza mediante el *stripping* de la correspondiente región anatómica peritoneal. Las lesiones que afectan al peritoneo visceral de forma focal y sin invadir en profundidad el aparato digestivo u otras estructuras anatómicas son electrovaporadas con el bisturí eléctrico hasta lograr la desaparición completa de los implantes y la esterilización del lecho tumoral. Los implantes voluminosos, la confluencia de varios de ellos o la invasión tumoral en profundidad de un órgano o estructura anatómica obligan a la exéresis del foco tumoral asociando la exéresis del órgano invadido. En las CP muy extendidas puede ser necesario realizar exéresis multiviscerales y resecciones intestinales amplias o multisegmentarias seguidas de

varias anastomosis digestivas. En el pseudomixoma peritoneal la afectación peritoneal puede ser muy extensa y requerir la práctica de numerosos procedimientos de peritonectomía (un porcentaje alto de estos pacientes requieren hasta los seis procedimientos de peritonectomías), con tiempos medios quirúrgicos de 12 a 15 horas. La extensión de la afectación tumoral del intestino delgado condiciona la citorreducción completa en algunos pacientes con CP. No debe contemplarse cirugía radical cuando la reserva intestinal residual, después de la citorreducción, no garantice una alimentación oral normal (síndrome de intestino corto). Con la finalidad de conseguir un mayor porcentaje de cirugías radicales se han descrito algunos procedimientos quirúrgicos encaminados a enlentecer el tránsito digestivo después de la extirpación extensa del intestino y/o de las válvulas digestivas. Otros límites para la citorreducción quirúrgica completa son la afectación del peritoneo visceral del hilio hepatobiliar, la retracción completa del mesenterio y/o la afectación masiva ganglionar retroperitoneal. Sólo después de lograda una cirugía radical CC0-CC1, está justificado continuar con el uso del tratamiento regional quimioterápico.

### **1.3.2 QUIMIOTERAPIA INTRAPERITONEAL PERIOPERATORIA.**

La quimioterapia regional pretende alcanzar concentraciones altas del agente citotóxico en un tumor localizado en un punto determinado del organismo. Algunos quimioterápicos permanecen en la cavidad abdominal atravesando el peritoneo gradualmente. Esto permite incrementar la concentración de sustancia activa en el abdomen y limitar la absorción del fármaco a nivel sistémico. Los fármacos que actúan a nivel intraperitoneal pueden ser administrados de forma aislada o en combinación. El peso molecular del fármaco, su liposolubilidad y la permeabilidad capilar determinan su paso a la circulación sistémica. Otros requisitos a considerar en la elección del quimioterápico intraperitoneal son su rápida eliminación de la circulación sistémica, no ser ciclo-celular específico e incrementar su eficacia con la hipertermia. Las concentraciones tisulares logradas con los quimioterápicos intraperitoneales son del orden de 20 a 400 veces superiores a las logradas mediante la administración endovenosa, y los gradientes peritoneo/plasmáticos, de 20:1 a 1.400:151. La penetración tisular tumoral del fármaco depende de su propia molécula, de su tiempo de contacto con los tejidos tumorales y de que sea potenciado por la hipertermia. Varios estudios han establecido en un máximo de 2-3 mm la penetración del fármaco en el tejido tumoral. Esta razón justifica que el tamaño máximo establecido para el residuo tumoral después de una cirugía radical sea igual o inferior a 2,5 mm. Los quimioterápicos más utilizados en asociación con la hipertermia intraperitoneal varían según el tumor primario que origina la CP. Las moléculas más utilizadas son el 5-fluorouracilo, la mitomicina C, la doxorubicina, el cisplatino, el paclitaxel, la gemcitabina, el etopósido, la bleomicina, el metotrexato, el melfalán, el interferón, el oxaliplatino y el irinotecán. La quimioterapia intraperitoneal obtiene sus máximos beneficios cuando es administrada inmediatamente a la citorreducción quirúrgica, es decir, antes del “atrapamiento” celular tumoral por la fibrina y de la compartimentación y por adherencias de la cavidad abdominal.<sup>40,41,42,43</sup>

### 1.3.3. HIPETERMIA

La hipertermia ha demostrado su eficacia clínica antitumoral en diversos estudios aleatorizados, ya sea como mecanismo directo por la mayor termosensibilidad de las células tumorales o debido al efecto potenciador que ejerce sobre la radioterapia y la quimioterapia. Administrada *in vitro* provoca la destrucción de las células tumorales cuando se alcanzan temperaturas de 43 °C. Las células normales resisten temperaturas de hasta 45 °C<sup>55</sup>. El metabolismo celular aumenta con la temperatura hasta un punto en que aparecen daños irreversibles. La ecuación de Arrhenius se utiliza para determinar la relación de la temperatura con la proporción de células destruidas por el calor. El punto crítico de las células humanas es de 43,5 °C. Temperaturas *in vitro* de 42,5 °C actúan sobre la presión intersticial de los tejidos tumorales favoreciendo la penetración de fármacos como la mitomicina C, el cisplatino, el oxaliplatino y el irinotecán, o actuando directamente sobre la propia célula y su composición molecular. Se han descrito efectos sobre el citoesqueleto celular, como cambios en la estabilidad y fluidez de la membrana celular, alteraciones en la forma celular, disminución de los mecanismos de transporte intercelular, alteraciones del potencial de membrana e inducción de apoptosis celular. A nivel de las proteínas intracelulares, se produce alteración en la síntesis proteica, desnaturalización de las proteínas, agregación de proteínas a la matriz nuclear e inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP). También se han descrito efectos sobre los ácidos nucleicos disminuyendo la síntesis de ARN/ADN, inhibiendo las enzimas reparadoras del ADN y alterando la conformación de éste. La hipertermia influye en la función celular afectando al metabolismo de diversos sustratos intracelulares, en la expresión de los genes y en las señales de transducción. Otros efectos de la hipertermia están relacionados con la respuesta celular inmunológica y, junto con otros factores, con la inducción de las ya referidas HSP que intervienen en la manifestación antigénica y la inmunidad tumoral. En estudios realizados con animales se ha demostrado el mayor beneficio terapéutico aportado por la quimiohipertermia frente a la hipertermia o la quimioterapia intraperitoneal administradas aisladamente. En la práctica clínica, los mayores efectos tumorocidas de la hipertermia se consiguen entre los 41 °C y los 43 °C. La pérdida de un grado de temperatura significa dividir por 10 la eficacia y por encima de 43 °C puede aparecer toxicidad, expresada fundamentalmente por lesiones sobre la permeabilidad y viabilidad del intestino delgado. Al igual que ha ocurrido con los procedimientos de peritonectomías, las técnicas de quimiohipertermia también están documentadas. Varios grupos de expertos han estudiado y publicado numerosos trabajos sobre el tipo y el volumen de las soluciones intraperitoneales utilizadas, el flujo de administración, el tiempo de exposición de la quimioterapia dentro del abdomen y la temperatura media intraperitoneal, factores todos ellos que influyen en la concentración del quimioterápico dentro del tejido tumoral. Básicamente, son dos las modalidades de aplicación de la quimiohipertermia peritoneal. La técnica descrita por Sugarbaker, denominada técnica abierta o *coliseum*, es la más extendida. Consiste en la administración de la HIPEC con el abdomen abierto, con la manipulación directa de la anatomía abdominal por parte del cirujano, después de extirpado el tumor y previamente a la realización de las suturas digestivas. La técnica cerrada,

preconizada fundamentalmente por Deraco, realiza la quimiohipertermia una vez finalizada la cirugía y las suturas digestivas, cerrando el abdomen y utilizando mayores volúmenes de líquidos de solución que provocan una mayor presión intraabdominal con el objetivo de incrementar la penetración del fármaco en los tejidos tumorales. No existe ningún estudio que demuestre un mayor beneficio clínico a largo plazo entre una u otra técnica de administración de la HIPEC. La factibilidad técnica de la HIPEC ha sido establecida en los últimos años. Varios trabajos han estudiado el efecto que la HIPEC puede provocar sobre el personal de quirófano; en este ámbito los efectos y las consecuencias descritas se consideran inapreciables, incluso en la aplicación de la HIPEC con el abdomen abierto. Existen en el mercado diferentes máquinas y material para la perfusión de quimioterápicos intraperitoneales que garantizan la seguridad en su aplicación. Algunos sistemas de perfusión intraperitoneal están digitalizados y permiten disponer de información gráfica sobre los aspectos más importantes en la aplicación de la HIPEC.<sup>54,53,60,61</sup>

La morbilidad del tratamiento multidisciplinar en la CP es importante. Las complicaciones pueden derivarse directamente de la cirugía, de la quimioterapia, de la hipertermia o de la suma de todas ellas. Se sitúa alrededor del 30%-65% de complicaciones tipo grado III-IV. La morbilidad quirúrgica específica es del 30% y corresponde fundamentalmente a dehiscencias de suturas digestivas, perforaciones y fístulas intestinales, colecciones, abscesos intraabdominales y sangrados postquirúrgicos, responsables todos ellos de que el 10% de los pacientes requieran una o varias reintervenciones quirúrgicas. Las complicaciones sistémicas corresponden a las de cualquier cirugía mayor, pero pueden estar encubiertas o incrementadas por los efectos tóxicos sistémicos, digestivos o hematológicos de la quimioterapia intraperitoneal. En los pacientes sometidos a peritonectomías, la disminución de la respuesta frente a la inflamación, provocada por la eliminación quirúrgica del peritoneo y el efecto de los quimioterápicos intraperitoneales, podría repercutir en una ausencia de dolor peritoneo-abdominal que alerte al clínico en caso de complicaciones abdominales postquirúrgicas. El seguimiento de estos pacientes se debe realizar durante los primeros días del postoperatorio en una unidad de pacientes críticos mediante protocolos específicos y por personal experto, y ante cualquier duda deben realizarse las correspondientes exploraciones de imagen que ayuden a confirmar el diagnóstico y tratar las complicaciones, evitando al máximo las reintervenciones innecesarias.<sup>65,67,68</sup>

La mortalidad descrita oscila entre el 0% y el 14%, si bien cifras del 2 al 6% aparecen como las más frecuentes en la mayoría de los estudios. La mortalidad está relacionada con el origen de la CP; las cifras más altas descritas corresponden a los pacientes tratados de pseudomixoma peritoneal. La mortalidad se ha relacionado con la intensidad de la agresión quirúrgica, que se refleja en el número de procedimientos de peritonectomías realizados, el ICP, el número de anastomosis digestivas practicadas y el volumen de sangre transfundida perioperatoriamente. Aunque la mortalidad media descrita en este complejo tratamiento no es superior a la referenciada en la cirugía mayor digestiva, el porcentaje y la importancia de la morbilidad y de las complicaciones quirúrgicas, que obligan a reintervenciones en pacientes muy frágiles, hacen necesaria una selección muy adecuada de los pacientes. Se recomienda el uso del tratamiento multidisciplinar en pacientes “jóvenes”, con

buen estado general y carcinomatosis razonablemente resecable. El ICP preestablecido como resecable está adaptado al origen tumoral de la CP. La morbilidad/mortalidad se relaciona directamente con la experiencia del equipo quirúrgico. Está demostrada la importancia de la curva de aprendizaje. Las series que aportan 100 o más pacientes suelen presentar un porcentaje menor de complicaciones y la gravedad de éstas también es menor. Los estudios que abordan la calidad de vida de los pacientes sometidos a cirugía radical seguida de quimioterapia peritoneal con o sin hipertermia concluyen que se trata de un tratamiento complejo y agresivo pero generalmente bien tolerado por los pacientes. Éstos vuelven a realizar una actividad similar a su patrón habitual previo a los 3 meses de la cirugía. Casi la mitad de los pacientes supervivientes a los 3 años vuelven a su trabajo habitual con la misma actividad que antes del tratamiento y ninguno de ellos refirió, a posterior, haberse replanteado el tratamiento recibido. Los pacientes más beneficiados, al utilizar las escalas de calidad de vida aplicadas, fueron aquellos que presentaban ascitis antes de la cirugía. Estos resultados fueron similares a los publicados por el National Cancer Institute (Bethesda) sobre un grupo de pacientes valorados a los 3, 6 y 9 meses después de cirugía citorreductora e HIPEC<sup>67</sup>. Se han realizado estudios de costo-eficiencia que analizan el valor del tratamiento multidisciplinar en pacientes con CP. El costo de la HIPEC por año de vida salvado, en pacientes bien seleccionados, es aceptable para una patología severa y sin otro tratamiento curativo alternativo. Estos resultados son también positivos cuando se comparan con situaciones clínicas semejantes por gravedad y pronóstico: trasplante hepático y tratamiento con nuevas moléculas: imatinib, en el tumor del estroma gastrointestinal (GIST), o trastuzumab, en el cáncer metastásico de mama.<sup>68,69,70</sup>

Actualmente el tratamiento multidisciplinar de la CP está considerado por los grupos de expertos como el tratamiento de referencia para el síndrome de pseudomixoma peritoneal o enfermedad gelatinosa del peritoneal, los mesoteliomas peritoneales, los carcinomas serosos primitivos del peritoneo y de otros tumores raros del peritoneo (psammocarcinomas, tumores desmoplásicos), y en las CP secundarias a los tumores apendiculares, colorrectales y algunos casos de carcinomas de ovario recurrentes y sarcomatosis peritoneal. El papel de este tratamiento también está en curso de evaluación en Europa para las carcinomatosis de origen gástrico. Estas indicaciones fueron objeto recientemente de consenso en la Journée Nationale du Traitement des Carcinomes Peritonéales par Chirurgie et Chimiothérapie Intrapéritoneale (París, mayo 2008)<sup>71</sup>, y de consenso internacional en el Fourth International Workshop on Peritoneal Surface Malignancy (Madrid, diciembre 2004), Peritoneal Surface Malignancy Workshop - Consensus Statement (Milán, noviembre 2006)<sup>72</sup> y en las Primeras Jornadas Médico - Quirúrgicas Internacionales sobre Carcinomatosis Peritoneal (Barcelona, noviembre 2007).<sup>88,89,90</sup>

El tratamiento multidisciplinar es un procedimiento terapéutico complejo, agresivo, costoso y con altos índices de morbimortalidad. Se recomienda su utilización en centros de referencia, por equipos especializados que hayan desarrollado una adecuada curva de aprendizaje y en grupos seleccionados de pacientes.

### **1.3.4 CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS PACIENTES CON CARCINOMATOSIS.**

Genéricamente utilizados para la indicación del tratamiento multidisciplinar pueden variar con relación al origen del tumor primario, pero quedan ampliamente reflejados en los siguientes puntos:

- Edad inferior a 70 años, pero los pacientes de mayor edad que presenten una CP poco extensa o invasiva y buen estado general pueden considerarse candidatos a este tratamiento.
- Carcinomatosis peritoneales consideradas resecables según los datos clínicos y paraclínicos preoperatorios: ausencia de retracción mesentérica, de retracción vesical, y de afectación masiva ganglionar retroperitoneal y/o por encima de los vasos renales.<sup>21,22,1112,126</sup>
- Pacientes con buen estado general (Eastern Cooperative Oncology Group) 1 o 2.
- Ausencia de insuficiencia cardiorrespiratoria, renal o hepática.
- Realización de TC craneal (en técnica de HIPEC a “abdomen cerrado”) para descartar patología cerebrovascular.
- El tratamiento ha de ser programado al menos 1 mes después de la administración de la última quimioterapia sistémica.
- Consentimiento informado específico.

### **OTROS CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS PACIENTES CON CARCINOMATOSIS.**

- Pacientes que presentan una CP de origen mamario, biliar, pancreático o broncopulmonar.
- Pacientes que presentan una CP juzgada como irreseccable por datos clínicos o paraclínicos: retracción mesentérica evidente en el TC, infiltración/ retracción vesical por endoscopia.
- Metástasis extraabdominales o hepáticas no resecables o que implican una hepatectomía que condicione una reserva hepática muy limitada.
- Imposibilidad de un seguimiento adecuado.
- Presencia de otra enfermedad tumoral maligna.
- Obstrucción intestinal completa.

- Infección activa u otra condición que impida o incapacite al paciente para recibir el tratamiento propuesto según el protocolo.

#### **1.4 MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN LA QUIMIOTERAPIA Y LA TERAPIA BIOLOGICA.**

##### **1.4.1 AGENTES CITOSTÁTICOS UTILIZADOS, DURACIÓN DE LA PERFUSIÓN Y TEMPERATURA.**

**Elección de los fármacos:** Las ventajas farmacocinéticas de la quimioterapia intraperitoneal son el factor más importante en el uso racional de HIPEC en la enfermedad maligna de superficie peritoneal.

El movimiento de los fármacos de peso molecular elevado desde la cavidad peritoneal al compartimiento circulatorio del organismo es mucho más lento que el aclaramiento de los fármacos desde el comportamiento sistémico. Este principio crea un gradiente de concentración debido a la barrera peritoneo-plasmática, fuertemente a favor de la concentración intraperitoneal. Las sustancias con unos pesos moleculares elevados son confinadas en la cavidad abdominal durante largos periodos, lo que permite realizar tratamientos de intensificación. La práctica de peritonectomias con la extirpación del peritoneo parietal no altera este fenómeno de santuario de cavidad peritoneal.<sup>105,116</sup>

Los fármacos citostáticos utilizados deben reunir las siguientes características:

- deben tener un elevado peso molecular y ser hidrosolubles.
- Deben ser rápidamente aclaradas de la circulación sistémica y su eficacia debe tener sinergia con la hipertermia.
- Deben ser fármacos no específicos de los ciclos celulares debido a que son citotóxicos incluso en periodos de exposición relativamente cortos.

Parece que cuanto mas elevada es la temperatura abdominal, mayor es el gradiente de concentración peritoneo-plasmático. La duración de la perfusión no parece guardar relación con el gradiente peritoneo-plasmático. En la mayoría de los estudios, la vida media del fármaco es < 90 minutos. No hay estudios suficientes sobre la profundidad de penetración de la MMC después de su administración intraperitoneal, pero si se dispone de estudios sobre la penetración tras la administración por instalación vesical en los que se ha comprobado su presencia en el urotelio, la lamina propia e incluso en capas musculares, lo que sugiere que penetra al menos algunos milímetros<sup>116,117</sup>.

Diversas drogas han sido utilizadas dependiendo del tipo de cáncer a tratar, múltiples estudios de farmacocinética han sido reportados en la literatura sin embargo el agente más estudiado ha sido la mitomicina-C, utilizada principalmente para la carcinomatosis del colon, apéndice y pseudomixoma peritoneal. La característica común de la mayoría de los agentes utilizados es su alto peso molecular para

incrementar la persistencia en la cavidad peritoneal y fármacos no dependientes del ciclo celular; otros agentes utilizados son el cisplatino, oxiplatino, irotecan, doxorubicina.<sup>110,111</sup>

Los fármacos mas utilizados con mas frecuencia y estudiados como agentes quimioterapeuticos intraperitoneales han sido la MNC (mitomicina C) intraoperatoria con un gradiente de concentración peritoneo-plasmático  $> 28$ , junto con el 5-FU en un régimen de quimioterapia intraperitoneal postoperatoria precoz. Recientemente se ha estudiado la aplicación intraperitoneal de nuevos fármacos considerados de segunda línea en el tratamiento sistémico de la enfermedad avanzada. Con estos nuevos esquemas se han conseguido los mejores resultados, con supervivencias a los 2 años del 74%; asimismo, se ha postulado si la adición de irinotecan al oxiplatino podría incluso mejorar en el futuro la eficacia de este tratamiento de intensificación locorregional intraabdominal.<sup>119</sup>

Se ha logrado consensar entre los distintos grupos que la dosis de la mitomicina-C debe ser entre los 15 y 35mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal (SC)<sup>4</sup>. Elías ha reportado supervivencia media de hasta 42 meses con el uso simultáneo de oxiplatino a dosis de 460mg/m<sup>2</sup> e irotecan 400mg/m<sup>2</sup> intraperitoneal en combinación con 5FU IV 400mg/m<sup>2</sup> de SC a 43 grados centígrados durante 30 minutos. Hay pocos trabajos sobre la dosis máxima tolerada en HIPEC. Los estudios farmacocinéticos realizados en el instituto de cáncer de Holanda<sup>52</sup> han demostrado una inaceptable toxicidad sistémica en dosis de 40 mg/m<sup>2</sup>, tras haber fijado el límite en su estándar de tratamiento en 35 mg/m<sup>2</sup>.<sup>85,86,112</sup>

Datos experimentales y clínicos indican que las células cancerosas son selectivamente destruidas con temperatura entre rango de 42°C a 43 °C, la hipertermia incrementa la citotoxicidad de las drogas, inhibe los mecanismos de reparación de la célula cancerosa, incrementa la permeabilidad de los fármacos en el tejido tumoral de 2mm a 4mm; temperaturas mayores pueden causar mayor toxicidad como quemaduras, fístulas de intestino, necrosis, hemorragia . Por tanto se recomienda que la temperatura en el interior de la cavidad abdominal debe ser de 43°C. Diferentes soluciones para perfundir la quimioterapia han sido probadas; NaCl 0.9% se utiliza para el cisplatino, dextrosa al 5% para el Irotecan y oxiplatino, solución de diálisis peritoneal al 1.5% para la mitomicina-C. las soluciones hipotónicas se han asociado con hemorragia y no se recomiendan. Durante la perfusión debe monitorizarse tanto la glicemia como concentración de sodio en sangre para prevenir complicaciones como hiponatremia e hiperglicemia.<sup>89,99,101</sup>

La mayoría de los grupos utilizan un volumen de 2L y la temperatura varía entre los 42°C y 43°C con tiempo de perfusión entre los 60 y 120 minutos de duración<sup>4</sup>. La tasa de flujo también varía considerándose apropiada una tasa de 2L/min. Sin embargo, esta debe ser adecuada a la técnica si es abierta o cerrada y al temperatura alcanzada en la cavidad peritoneal. Se han utilizado sistemas computarizados integrales para la administración de la quimioterapia no obstante el principio básico es una bomba de rodillo y un intercambiador de calor que pueda ser manipulado y subir la temperatura de la quimioterapia para poder alcanzar los 43°C en el interior de la cavidad peritoneal.

Índice de carcinomatosis peritoneal y selección de pacientes. La introducción de la cirugía citorrreductora combinada con regímenes de quimioterapia

intraperitoneal promete aumentar los tiempos de supervivencia en pacientes seleccionados con carcinomatosis peritoneal. Esta alternativa al tratamiento agresivo en la enfermedad diseminada peritoneal compromete la practica de peritonectomias para el tratamiento de la enfermedad macroscópica, la administración de HIPEC para el control de la enfermedad microscópica y una selección juiciosa de los pacientes.<sup>119</sup>

Los parámetros clínicos necesarios para la selección juiciosa de pacientes incluyen:

- Tipo histológico de tumor (progresión invasiva frente a la expansiva o por oposición),
- Grado de la enfermedad.
- Grado de citorreduccion conseguido.

Es imprescindible la correcta selección de los pacientes para conseguir optimizar los resultados. Se ha utilizado diferentes índices para determinar el grado de afección peritoneal, lo que permite estatificar a los pacientes y correlacionarlos con los resultados obtenidos.

Gómez portilla desarrollo un método objetivo para determinar el grado de la enfermedad conocido como índice de carcinomatosis peritoneal (ICP). Con este método se mide la presencia de enfermedad y su tamaño en 13 diferentes regiones abdominales antes de realizar la cirugía citorreductora y se determina con una puntuación el tamaño lesional: LS0 cuando no hay enfermedad visible, LS1 ante tumor < 0.5cm. LS2 con tumor < 5cm. Y LS3 cuando el tamaño tumoral es > 5 cm.

El sumatorio del tamaño lesional en cada una de las regiones abdominopelvicas constituye el IPC.

Al finalizar la citorreduccion se determina el grado de enfermedad residual mediante el índice de citorreduccion obtenido, que refleja la ausencia de enfermedad microscópica, que refleja la ausencia de enfermedad microscópica residual:CC0 indica que no queda enfermedad microscópica visible al finalizar la citorreduccion, CC1 significa que tras la citorreduccion persisten implantes tumorales <2.5mm. Limite del tamaño tumoral que se considera tratable mediante la quimioterapia de intensificación locorregional intraabdominal, CC2 indica un residuo tumoral tras la citorreduccion entre 2.5 mm. Y 2.5cm. y finalmente, CC3 implica un tamaño > 2.5 cm. Del tumor residual tras la citorreduccion o una confluencia de nódulos no resecaados en cualquiera de las regiones abdominopelvicas antes enumeradas. Una citorreduccion CC2 o CC3 es considerada paliativa por incompleta y en ella no procede la administración de quimioterapia intraperitoneal, al ser ineficaz.

Ambos índices, el ICP y el índice de citorreduccion conseguida, son los principales factores pronósticos en este tipo de enfermedades.

El uso de estos índices será imprescindible, por cuanto no ayudara a seleccionar a los pacientes y evitara cirugías innecesarias en pacientes de alto riesgo que no se beneficiaran de esta modalidad de tratamiento, ya que solo se ha

conseguido obtener supervivencias prolongadas en pacientes con una citorreducción completa. El cirujano debe recordar que no hay supervivientes a largo plazo a no ser que reconsiga una citorreducción completa de la enfermedad. La presencia de enfermedad residual en lugares anatómicos difíciles y cruciales puede en ocasiones comprometer un ICP inicialmente favorable<sup>20</sup>. Los enfermos con enfermedad sistémica metastásica obviamente no son candidatos a este tratamiento<sup>52</sup>.

La utilización del ICP permitirá en el futuro seleccionar a los pacientes susceptibles de tratamiento oncoquirúrgico; una contraindicación será un índice de carcinomatosis peritoneal >4.

Cuando en el transcurso de una laparotomía se detecta de forma inesperada una enfermedad diseminada peritoneal, la actitud más conveniente para el paciente sería la realización de una estadificación intraoperatoria de la enfermedad y su localización lo más detallada posible; esto se debería acompañar del menor gesto quirúrgico que permita solucionar temporalmente la situación, y posteriormente remitiendo al paciente a un centro de referencia especializado en la aplicación de este tipo de tratamiento combinado, siempre que reúna las características de buen estado general con ausencia de comorbilidad limitante y de enfermedad a distancia extrabdominal o enfermedad metastásica intrabdominal no controlable quirúrgicamente<sup>60,61</sup>.

**Complicaciones.** La morbilidad y mortalidad asociadas con esta terapia combinada de citorreducción oncológica radical y quimioterapia de intensificación abdominal son altas<sup>53</sup>. Estas pueden derivar directamente de la cirugía, de la hipertermia, de la quimioterapia o de la suma de todas ellas<sup>62,63</sup>.

Se han publicado tasas de morbilidad y mortalidad muy diversas, con cifras de 0-43% de morbilidad y de 0-20% de mortalidad las principales causas de muerte son la perforación intestinal o la dehiscencia de las suturas. También se ha descrito la formación de fístulas intestinales, fuga biliar, pancreatitis o hemorragias postoperatorias. Entre las complicaciones sistémicas, además de las habituales de toda cirugía completa (trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, neumotórax, insuficiencia cardíaca o infartos cerebrales). La aplasia medular o el desarrollo de efectos tóxicos hematológicos son las más temidas<sup>64,65</sup>.

Es difícil separar las complicaciones secundarias a la cirugía de las relacionadas con la HIPEC, tanto por el calor como por los citostáticos, pero la mayoría de las complicaciones descritas parecen relacionarse sobre todo con el grado de agresión quirúrgica. La complicación intestinal más frecuente sigue siendo la perforación causada por el traumatismo quirúrgico en la superficie intestinal durante la resección de implantes viscerales, posiblemente agravado por la acción de calor y fármacos citostáticos<sup>66</sup>.

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

Sin embargo, Shido et al han demostrado que la hipertermia por si sola no es la causante del daño visceral cuando se usa en procedimientos con HIPEC.

La aplasia medular es un claro resultado de la aplicación de quimioterapia intraperitoneal y depende del fármaco y la dosis. El nadir de la aplasia medular parece a las 2 semanas en la quimioterapia intraperitoneal, frente a las 4-6 semanas en la quimioterapia sistémica<sup>58</sup>.

La insuficiencia renal tóxica aparecen cuando se utilizan esquemas con cisplatino, por lo que precisa siempre la utilización de quelantes tipo tiosulfato.

La mortalidad y morbilidad están en relación directa con la curva de aprendizaje y la técnica quirúrgica empleada<sup>119</sup>.

En conclusión la carcinomatosis peritoneal ha sido considerada como una entidad fatal y clásicamente tratada de forma paliativa.

Spratt y cols (1970) fueron los primeros en utilizar quimioterapia con hipertermia en estudios experimentales con el objetivo de optimizar el efecto citotóxico de las drogas. En 1979 se realizó la primera quimioterapia intraperitoneal con hipertermia en un paciente portador de pseudomixoma peritoneal después de cirugía citorrreductora. Desde 1982 el Dr. PH Sugarbaker planteó la diseminación peritoneal de ciertos cánceres como un estadio locoregional de la enfermedad y desarrolló una alternativa terapéutica basada en el tratamiento quirúrgico de la enfermedad macroscópica peritoneal mediante cirugía citorrreductora radical seguida de quimioterapia intraperitoneal con hipertermia para tratar la enfermedad microscópica residual. Con este planteamiento terapéutico se obtuvieron supervivencias a 5 años del 30 y 50% en grupos seleccionados de pacientes que hasta entonces eran considerados pacientes terminales. Resultados similares han sido comunicados por otros grupos tras la implementación de esta compleja técnica<sup>112,122</sup>.

Como es de esperar los mejores resultados se obtienen en aquellos casos en los que existe menor volumen de carcinomatosis y en los que la cirugía ha conseguido una buena citorreducción. Un índice de carcinomatosis superior a 13 según el esquema de Sugarbaker es sinónimo de mal pronóstico. Por otro lado el resultado está relacionado con la selección adecuada de los pacientes que pueden beneficiarse de este tratamiento.<sup>59</sup>

Los efectos antineoplásicos de la quimioterapia son potenciados por el calor en virtud del aumento de la permeabilidad celular, por alteración del transporte activo de las drogas y la alteración del metabolismo celular.

La administración de altas dosis de quimioterapia intraperitoneal es posible sin toxicidad renal ni sistémica. Al mismo tiempo se minimizan los efectos secundarios ya que el paciente permanece anestesiado y en todo momento se mantiene monitorizados todos los parámetros<sup>60</sup>.

A la luz de los datos expuestos nos encontramos ante una modalidad terapéutica prometedora. La adecuada selección de pacientes, el perfeccionamiento de los procedimientos técnicos y la disponibilidad de nuevos terapéuticos se traducirá en mucha probabilidad en una mejoría sustancial de los resultados. La combinación con otras modalidades terapéuticas, locoregionales o sistémicas, abre líneas de trabajo esperanzadoras para un conjunto de pacientes que en este momento carecen de perspectiva más allá de la paliación<sup>71,72</sup>.

### **1.4.2 5 – FLUOROURACILO.**

#### **Antecedentes**

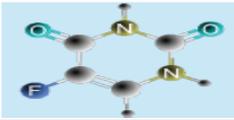
El primero en informar sobre la síntesis y actividad biológica del 5-fluorouracilo fue el equipo de trabajo del doctor Charles Heidelberger y sus colegas a finales de la década de los cincuenta. Fue uno de los primeros fármacos utilizados en oncología y desde que se descubrió la característica carcinostática del 5-fluorouracilo, se han buscado maneras de atacar las células tumorales y estudiado la forma en que éste fármaco actúa. Posteriormente se desarrollaron derivados con resultados mas o menos satisfactorios.<sup>110,111</sup>

#### **Farmacología**

El 5-fluorouracilo es un fármaco que bloquea la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de una enzima que es importante para la síntesis de la timidina, que siendo parte de la molécula de ADN detiene su formación. El fármaco es específico del ciclo de fase celular, fase S.<sup>110</sup>

#### **Mecanismo de acción**

El 5-fluorouracilo interviene en la síntesis de ADN e inhibe en poco grado la formación de ARN. Ambas acciones se combinan para promover un desequilibrio metabólico que resulta en la muerte de la célula. La actividad inhibitoria del fármaco, por su analogía con el ácido nucleico uracilo, tiene afectación sobre el veloz crecimiento de las células neoplásicas que aprovechan preferentemente la molécula del uracilo<sup>112</sup>

|   |                       |
|---|-----------------------|
|  |                       |
| <b>5-fluorouracilo</b>  |                       |
|  |                       |
| <b>Nombre (IUPAC) sistemático</b>   |                       |
| 5-Fluoropirimidina-2,4-diona  |                       |
| <b>Identificadores</b>  |                       |
| Número CAS  | 51-21-8 [1]           |
| Código ATC  | L01BC02 [2]           |
| PubChem   | ?                     |
| ChEBI   | ?                     |
| <b>Datos químicos</b>   |                       |
| Fórmula   | $C_4H_4FN_2O_2$       |
| Peso mol.   | 130.078 g/mol         |
| <b>Farmacocinética</b>  |                       |
| Biodisponibilidad   | ?                     |
| Metabolismo   | En hígado             |
| Vida media  | ?                     |
| Excreción   | Por pulmones y orina. |
| <b>Consideraciones terapéuticas</b>   |                       |
| Cat. embarazo   | ?                     |
| Estado legal  |                       |
| Vías adm.   | Oral y parenteral     |

biosíntesis del ácido nucleico. Los efectos de una privación de ADN y ARN atacan más a las células que crecen y se multiplican sin control que a las normales. Su eficacia radica en que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. La timina es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ADN, y su carencia implica que el ADN no se puede replicar, lo que inhibe la división celular, y por tanto, el crecimiento tumoral.<sup>112</sup>

### Indicaciones

El 5-fluorouracilo se utiliza en enfermedad de Bowen, basaliomas superficiales solos o acompañados. Estados precancerosos y en situaciones en que la radiación sea imposible o no se pueda intervenir quirúrgicamente. Se ha notado que el 5-fluorouracilo no tiene eficacia alguna en espinaliomas. La solución inyectable se utiliza en ciertos casos como paliativo de los carcinomas de mama, recto y colon cuando no pueda intervenir quirúrgicamente<sup>116</sup>.

### Advertencias y precauciones

Las mujeres embarazadas deben evitar el medicamento a menos que el oncólogo tratante lo autorice según su análisis de la historia clínica. En la aplicación tópica, la superficie cutánea tratada no debe ser mayor de 500 cm<sup>2</sup>, alrededor de 23 X 23 cm.<sup>117</sup>

### Formas farmacéuticas

- Ampolleta conteniendo 250 mg endovenosa.
- Crema tópica al 1% y 5%.
- Solución tópica al 1%, 2% y 5%.

### 1.4.3 BEVACIZUMAB.

Es un anticuerpo monoclonal humanizado. Un anticuerpo monoclonal es una proteína que reconoce y se une de forma específica y única a otra proteína del organismo. Bevacizumab ha demostrado su eficacia en el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas como el cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de células renales. Bevacizumab está en fase de investigación en otras patologías tumorales. En el cáncer de colon o recto avanzado, bevacizumab se utiliza habitualmente en combinación con otros fármacos antitumorales como 5-fluoruracilo, ácido folínico, irinotecan y otros. En cáncer de mama metastático se ha demostrado su eficacia en combinación con otro fármaco llamado paclitaxel. En el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, Bevacizumab se administrará junto a una quimioterapia basada en derivados del platino<sup>121</sup>.

### Farmacología

El bevacizumab se une de forma selectiva a una proteína que se llama factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), que se localiza en las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos del organismo. El VEGF es necesario para que los vasos sanguíneos crezcan dentro del tumor, que lo suplen con nutrientes y oxígeno. Cuando el bevacizumab se une al VEGF, bloquea su función correcta, con lo que previene el crecimiento del tumor al bloquear el crecimiento de los vasos sanguíneos que aportan los nutrientes y oxígeno necesarios para el Bevacizumab<sup>121,122</sup>.

| <b>Bevacizumab</b>  |  |
|---|--|
|  <i>Aviso médico</i> |  |
| <b>Nombre (IUPAC) sistemático</b>   |  |
| Agentes antineoplásicos, anticuerpo monoclonal, código ATC: L01XC07                                   |  |
| <b>Identificadores</b>  |  |
| Número CAS  | ?  |
| Código ATC  | L01XC07 <sup>[1]</sup>                           |
| PubChem   | ?  |
| DrugBank  | BTDO0067 <sup>[2]</sup>                          |
| ChEBI   | ?  |
| <b>Datos químicos</b>   |  |
| Fórmula   | ?  |
| Peso mol.   | 149,000 kDa                                      |
| <b>Farmacocinética</b>  |  |
| Biodisponibilidad   | 100% (IV)  |
| Metabolismo   | ?  |
| Vida media  | 20 días (rango: 11–50 días)                      |
| Excreción   | ?  |
| <b>Consideraciones terapéuticas</b>   |  |
| Cat. embarazo   | ?  |
| Estado legal  | <input type="checkbox"/> Prescripción Únicamente |
| Vías adm.   | Terapia intravenosa                              |

### Mecanismo de acción

Bevacizumab se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), inhibiendo así la unión de éste a sus receptores Flt 1 (VEGFR 1) y KDR (VEGFR 2), situados en la superficie de las células endoteliales. Al neutralizar la actividad biológica del VEGF se reduce la vascularización de los tumores y, por tanto, se inhibe el crecimiento del tumor<sup>121,122,124</sup>.

### Eficacia

Bevacizumab se utiliza para el tratamiento del cáncer de colon o recto avanzado. Este medicamento se administrará con quimioterapia que contenga otros medicamentos llamados 5-fluorouracilo y ácido folínico. Otro medicamento llamado irinotecan también puede ser parte de la quimioterapia. Bevacizumab se utiliza también para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Cuando se utilice en pacientes con cáncer de mama, se administrará con un quimioterápico llamado paclitaxel. Bevacizumab se utiliza también para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico avanzado. Bevacizumab por lo general se administrará junto con un régimen de quimioterapia con platino<sup>124</sup>.

### Efectos Secundarios

Al igual que todos los medicamentos, Bevacizumab puede producir efectos adversos, aunque no todas las personas sientan efectos no deseados o lo sientan de modos distintos. Si se considera que alguno de los efectos adversos que sufre el individuo es grave o si se aprecia cualquier efecto adverso no mencionado en este prospecto, informe a su médico o farmacéutico. Los efectos adversos que se mencionan a continuación se han observado cuando se administra Bevacizumab con quimioterapia. Esto no significa necesariamente que estos efectos adversos fueran estrictamente causados por Bevacizumab<sup>122</sup>.

- Los efectos adversos clasificados como muy frecuentes se presentaron en al menos 1 de cada 10 pacientes.
- Los efectos adversos clasificados como frecuentes se presentaron en al menos 1 de cada 100 pacientes.

Los efectos adversos frecuentes (al menos 1 de cada 100 pacientes) más graves incluyen: perforación del intestino, sangrado, incluyendo hemorragia en los pulmones en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, bloqueo de las arterias por embolia, bloqueo de las venas de los pulmones por embolia. Los efectos adversos graves que pueden ser muy frecuentes (al menos 1 de cada 10 pacientes) incluyen: elevación de la tensión arterial, problemas con la cicatrización de heridas tras la cirugía, sensación de entumecimiento u hormigueo en manos o pies, disminución del número de células sanguíneas, incluyendo los glóbulos blancos que ayudan a luchar frente a las infecciones, y las plaquetas que ayudan a que la sangre coagule, sensación de falta de energía o cansancio, náuseas y vómitos. Otros efectos adversos graves que pueden resultar ser frecuentes (al menos 1 de cada 100 pacientes) incluyen dolor abdominal, sequedad de boca combinada con sed y/o cantidad de orina reducida o de color oscuro, diarrea, dolor, incluyendo dolor de cabeza, trombosis en las venas de las piernas o dificultad para conseguir que la sangre coagule, focos localizados de pus, infección, y en particular infección en la sangre o vejiga, disminución del riego sanguíneo al cerebro o apoplejía, embolia en las arterias que puede provocar una apoplejía y un ataque al corazón, sensación de sueño o desmayo, problemas de corazón con dificultad al respirar, sangrado por la nariz, aumento del ritmo cardíaco, obstrucción intestinal, prueba de orina anormal (proteínas en la orina), dificultad al respirar o disminución de los niveles de oxígeno en sangre. Los efectos adversos que pueden ser raros (al menos 1 de cada 10.000 pacientes) incluyen convulsiones, dolor de cabeza, confusión o alteraciones en la visión. Los efectos adversos muy frecuentes (al menos 1 de cada 10 Bevacizumab que no fueron graves son: elevación de la tensión arterial, dolor, falta de energía, estreñimiento, sangrado por la parte inferior del intestino grueso, inflamación de la boca, pérdida del apetito. Los efectos adversos frecuentes (al menos 1 de cada 100 pacientes) que no fueron graves fueron: problemas respiratorios, sangrado por la nariz, congestión nasal, piel seca, descamación e inflamación de la piel, cambio del color de la piel, cambios en el sentido del gusto, problemas oculares (lagrimeo). Otros efectos adversos menos frecuentes de cualquier gravedad que se observaron fueron fallo cardíaco y sangrado de la mucosa de la boca o de la vagina. Se han notificado casos muy raros (menos de 1 por cada 10.000 pacientes) de perforación del septum nasal . Algunos efectos

adversos son más frecuentes en ancianos. Estos efectos adversos pueden ser embolia en las arterias que puede provocar apoplejía o un ataque cardíaco. Además, los pacientes ancianos tienen mayor riesgo de que se reduzca el número de glóbulos blancos y plaquetas en serico. Bevacizumab también puede causar cambios en las pruebas de laboratorio que le haga su médico. Estos cambios pueden incluir una reducción del número de glóbulos blancos sanguíneos, en particular neutrófilos (un tipo de células blancas que facilitan la protección frente a infecciones), presencia de proteínas en la orina, disminución del potasio, sodio o fósforo en sangre, aumento del azúcar en sangre, aumento de la fosfatasa alcalina, en sangre, disminución de la hemoglobina, que puede ser grave<sup>123</sup>.

### **Contraindicaciones**

Hipersensibilidad al principio activo o a alguno de los excipientes.

- Hipersensibilidad a productos derivados de células de ovario de hámster chino (CHO), o a otros anticuerpos recombinantes humanos o humanizados.
- Embarazo
- Bevacizumab está contraindicado en pacientes con metástasis no tratadas localizadas en el sistema nervioso central.

### **Disponibilidad**

El Bevacizumab es un medicamento ético y su presentación es en vial Bevacizumab 25 mg/ ml. Cada vial contiene bien 100 mg de bevacizumab en 4 ml o bien 400 mg en 16 ml.

## **2. NEOVASCULARIZACION**

El correcto funcionamiento de los tejidos del organismo requiere un aporte de sangre suficiente, a través de un sistema organizado de arterias, capilares y venas. La formación de los vasos sanguíneos es un proceso complejo que implica la interacción perfectamente coordinada de múltiples tipos celulares, jugando un papel decisivo en el desarrollo embrionario y en el periodo postnatal temprano. En etapas posteriores, continúa existiendo formación de nuevos vasos sanguíneos, como por ejemplo en el ciclo ovárico, o en la reparación de tejidos dañados. El término angiogénesis no abarca todo el espectro de acontecimientos que conllevan al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, de manera que referiremos como neovascularización al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en general. La neovascularización es el resultado de varios procesos, incluyendo vasculogénesis, arteriogénesis, y angiogénesis<sup>129</sup>.

## 2.1 VASCULOGENESIS

Vasculogénesis es la formación de los primeros vasos sanguíneos durante la embriogénesis. Empieza con la agrupación en islotes sanguíneos de angioblastos derivados del mesodermo; las células de la parte central de estos islotes sanguíneos se diferencian a células precursoras hematopoyéticas, mientras que las células más externas dan lugar a células endoteliales. A continuación, las células endoteliales maduras forman una serie de tubos endoteliales componiendo una red vascular que va aumentando en complejidad mediante un proceso angiogénico. Existen evidencias de que el proceso de vasculogénesis puede ocurrir en el adulto, mediado por las células progenitoras endoteliales<sup>129</sup>.

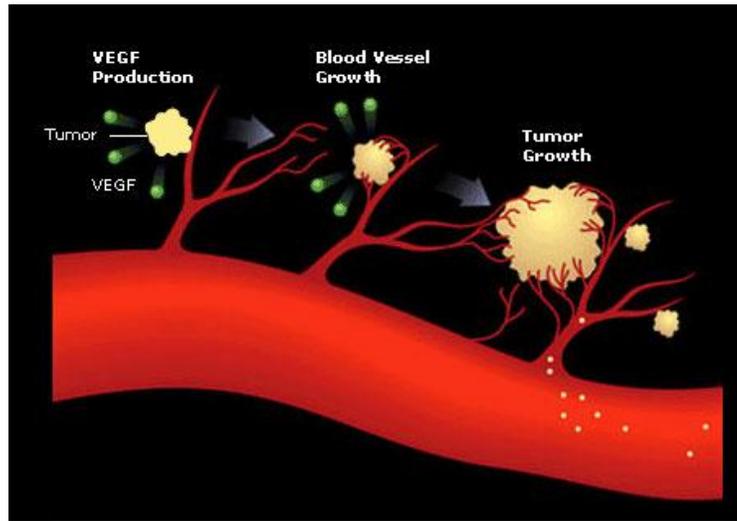
## 2.2 ARTERIOGENESIS

Arteriogénesis se denomina al proceso de maduración y posible formación de nuevos conductos colaterales. La arteriogénesis se produce normalmente en zonas con estenosis arterial, donde existe un cambio local en las fuerzas de cizallamiento, inducido por la acumulación de células mononucleares sanguíneas. En 1669, el anatomista Lower demostró la existencia de colaterales anastomosadas en el corazón humano. En 1953, el cirujano inglés Longland, describió las arterias colaterales en la circulación de la pierna, definiendo las arterias colaterales como vasos que interconectaban diferentes zonas de perfusión. Estas arterias colaterales funcionales crecen y proliferan a partir de ramas arteriales preexistentes, mostrando un típico fenotipo tortuoso. De esta manera, el crecimiento de las arterias colaterales, a diferencia de la angiogénesis y la vasculogénesis, no es una forma de crecimiento *de novo*, sino que consiste en la remodelación de un vaso pequeño preexistente, para dar un vaso mayor, con los cambios correspondientes en su estructura; este vaso de mayor calibre podría resistir el aumento de las fuerzas de presión debidas a un incremento en la perfusión. Aunque estudios previos han mostrado como una buena circulación colateral disminuye los riesgos de infarto de miocardio y de muerte por una oclusión completa de la arteria coronaria, en la mayoría de los casos este sistema no es suficiente. Esto es debido a que el rango de oclusión de la arteria suele ser mayor que la arteriogénesis que se produce. Actualmente, un área de gran interés clínico es la estimulación y aceleración de la arteriogénesis, la cual podría ayudar a proteger los tejidos sometidos a una isquemia severa, cuando la arteria principal se encuentra ocluida<sup>129,130</sup>.

## 2.3 ANGIOGENESIS

El término angiogénesis fue acuñado por el cirujano británico John Hunter en 1787, para describir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Tras casi doscientos años en los que la angiogénesis fue escasamente investigada, el doctor Judah Folkman en 1971 propuso la hipótesis de que el crecimiento tumoral era angiogénesis dependiente. Desde este momento las publicaciones científicas sobre la angiogénesis han aumentado de manera logarítmica. Actualmente, la angiogénesis se define como

la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de otros preexistentes. En adultos este proceso puede ser activado en tejidos sometidos a hipoxia, mediante la expresión del factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ). El HIF-1 $\alpha$  activa la transcripción de numerosos genes, incluyendo entre ellos el VEGF y sus receptores<sup>129,130</sup>.



**FIG 1 Relación del VEGF en la producción de nuevos vasos sanguíneos así como la íntima relación que guarda con los tumores de cualquier estirpe.**

### 2.3.1 EL PROCESO ANGIOGENICO

La formación de un nuevo vaso supone la activación de células endoteliales quiescentes, la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular, la migración y la proliferación de células endoteliales, la formación de redes vasculares y la anastomosis entre ellas que permita establecer el flujo sanguíneo. Estos pasos están controlados mediante señales intracelulares y extracelulares que están perfectamente coordinadas en el tiempo y en el espacio, como se describe a continuación. En primer lugar, el tejido dañado produce y libera factores de crecimiento que difunden a los tejidos vecinos. Estos factores de crecimiento angiogénicos se unen a receptores específicos, localizados en las células endoteliales de vasos sanguíneos cercanos. Cuando los factores de crecimiento se unen a sus receptores, las células endoteliales se activan y liberan distintas moléculas enzimáticas, como MMP y endopeptidasas extracelulares, las cuales no se expresan de forma constitutiva sino que se inducen de forma temporal, en respuesta a señales exógenas como citoquinas, factores de crecimiento o interacciones entre la célula y la matriz extracelular. Dichas enzimas provocan pequeños orificios en la membrana basal que rodea a los vasos preexistentes, aumentando la permeabilidad y permitiendo la extravasación hacia la matriz de proteínas plasmáticas como fibrinógeno y protrombina, así como de las células endoteliales que comienzan a dividirse, proliferar y migrar a través de los orificios de los vasos hacia el tejido dañado. La

destrucción del estroma circundante es esencial para permitir la proliferación y agrupación de las células endoteliales para formar el nuevo vaso. Las MMP poseen la capacidad de degradar la matriz extracelular, facilitando el movimiento y proliferación celular a través del estroma, y la liberación de factores proangiogénicos que, en condiciones normales, se encontrarían secuestrados por la matriz extracelular. El movimiento y agrupación de las células es mediado por las interacciones de las integrinas con la matriz extracelular. Estas integrinas incluyen la  $\alpha v \beta 3$  que se expresa en bajos niveles de forma constitutiva en los vasos, pero es estimulada en la superficie de las células endoteliales por el VEGF. La interacción entre el VEGF y  $\alpha v \beta 3$  activa una vía de señalización calcio-dependiente que promueve la migración celular. Las células endoteliales se agrupan en forma de tubo para crear el nuevo vaso y se producen anastomosis entre los distintos vasos individuales, permitiendo la circulación sanguínea entre ellos. El proceso angiogénico termina con la maduración de los vasos neoformados, donde tienen un papel fundamental los pericitos. Los pericitos son células perivasculares de origen mesenquimal. Interaccionan con las células endoteliales facilitando la unión de las células en forma de tubo, así como la remodelación y estabilización del lecho vascular recién formado. En este último proceso intervienen el PDGF y las angiopoyetinas. Existen condiciones fisiológicas en las que se produce un aumento de la angiogénesis, como en el ciclo menstrual de la mujer, la hipertrofia del tejido muscular tras ejercicio intenso, la regeneración nerviosa y ósea y el proceso normal de cicatrización de las heridas. Asimismo, la angiogénesis está implicada en el desarrollo de diferentes procesos patológicos (enfermedades angiogénesis dependientes) de distinta índole, incluyendo, enfermedades cardiovasculares, malformaciones vasculares, arteriosclerosis, artritis reumatoide, crecimiento tumoral, retinopatía diabética y psoriasis. El cambio hacia el fenotipo angiogénico en un determinado tejido depende del balance local entre factores estimulantes e inhibidores de la angiogénesis. Para conseguir el estímulo angiogénico se requiere no sólo la regulación positiva de factores angiogénicos, sino también la negativa de los inhibidores de la angiogénesis<sup>122,123,124</sup>.

### 2.3.2 ENFERMEDADES ANGIOGENESIS DEPENDIENTES

En todo proceso biológico la angiogénesis está regulada por una serie de moléculas intra y extracelulares que tienen acción estimuladora o inhibidora sobre la angiogénesis, las cuales coordinadas entre sí, permiten un equilibrio perfecto. La lista de factores estimuladores e inhibidores es muy extensa. Como se ha mencionado anteriormente, existen procesos patológicos en los que este balance perfecto se inclina hacia alguno de los dos sentidos, dando lugar a una angiogénesis exagerada o insuficiente. En 1994, la Angiogenesis Foundation definió la angiogénesis como el “factor denominador” de las enfermedades más importantes que afectan a la población<sup>122,123</sup>.

### 2.3.3 FACTORES ESTIMULADORES E INHIBIDORES DE LA ANGIOGÉNESIS

#### ESTIMULADORES INHIBIDORES

Factores de crecimiento<sup>125</sup>

*VEGF (factor de crecimiento para el endotelio vascular)*

*FGF (factor de crecimiento para fibroblastos)*

*PLGF (factor de crecimiento placentario)*

*PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)*

*TGF- $\alpha$  (factor de transformación  $\alpha$ )*

*TGF- $\beta$  (factor de transformación  $\beta$ )*

*HGF (factor de crecimiento de hepatocitos)*

Citoquinas

*MCP-1 (proteína-1 atrayente de monocitos)*

Quimioquinas

*IL-8 (interleuquina 8)*

Hormonas

*Estrógenos*

*Prostaglandinas E1 y E2*

Factores de crecimiento hematopoyéticos

*Eritropoyetina*

Péptidos proteolíticos

*Angiostatina*

*Endostatina*

Inhibidores enzimáticos

*TIMP (inhibidores de metaloproteasas)*

*Inhibidores de la activación de plasminógeno*

Citoquinas

*Interferon*

*IL-12 (interleuquina 12)*

Quimioquinas

*PF-4 (Factor plaquetario 4)*

Moléculas de matriz extracelular

*Trombospondina*

Hormonas 2-ME (2-metoxiestradiol)

### **2.3.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS A UN EXCESO DE ANGIOGÉNESIS**

Cuando el tejido dañado produce cantidades anormales de factores angiogénicos, se solapa la acción de los inhibidores endógenos, dando lugar a la formación de nuevos vasos que nutren el tejido enfermo, destruyen el tejido normal y en ocasiones, como ocurre en el caso de los tumores, permiten la diseminación del mismo a otras partes del organismo (metástasis). La angiogénesis exacerbada se asocia a diferentes enfermedades como: cáncer, retinopatía diabética, degeneración macular senil, artritis reumatoide, complicaciones del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA), psoriasis y otras enfermedades cutáneas<sup>127,128</sup>

### **2.4 FACTORES DE CRECIMIENTO LA FAMILIA DEL VEGF**

El VEGF, a veces conocido como VEGF-A o factor de permeabilidad vascular, es el miembro mejor estudiado de la familia de ligandos VEGF. Estas proteínas forman parte de la familia de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), un grupo de proteínas que comparten una estructura similar, con entrecruzamientos intermoleculares e intramoleculares por puentes disulfuro para dar lugar a una estructura en lazo inconfundible. El VEGF es un ligando para los receptores denominados receptores del factor de crecimiento para el endotelio vascular, VEGFR-1 y VEGFR-2, también conocidos como Flt-1 y KDR ó Flk-1. Hasta la fecha se han identificado siete miembros de la familia del VEGF. El VEGF, junto con el VEGF-B, el VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PLGF), preferentemente, aunque no de forma exclusiva, ejercen sus efectos sobre las células endoteliales vasculares, mientras que el VEGF-C y el VEGF-D actúan sobre las células endoteliales linfáticas. El VEGF, el VEGF-B y el VEGF-E están involucrados en la angiogénesis y el VEGF parece ser el factor más importante en este proceso. El VEGF-C y el VEGF-D están involucrados en la linfangiogénesis (Achen y. El último miembro incorporado a la familia del VEGF es el svVEGF identificado en el veneno de serpientes.

El VEGF posee al menos nueve isoformas procedentes de un único gen por splicing alternativos: VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189, y VEGF206. VEGF165b es un inhibidor endógeno del VEGF, que se une a VEGFR-2, con la misma afinidad que el VEGF165, pero sin activar la cascada de señalizaciones. El VEGF es producido por una gran variedad de células, entre otras, células endoteliales, macrófagos, y células T activadas. Las cuatro isoformas principales son VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206, de las cuales el VEGF165 es el predominante. Otras isoformas descritas como el VEGF145 y VEGF183 son menos frecuentes (Houck y col., 1992). Una diferencia importante entre las distintas isoformas es su afinidad por la heparina, lo que afecta a su unión a la superficie celular y a la matriz extracelular. El VEGF121 no se une a la heparina y por eso es una proteína soluble, mientras que el VEGF189 y el VEGF206 tienen una fuerte afinidad por la heparina y se mantienen unidos a la matriz extracelular. El VEGF165 tiene una afinidad reducida por la heparina, por lo que una proporción significativa de la proteína permanece unida mientras que la

mayor parte es soluble. Las isoformas unidas a la matriz extracelular pueden ser liberadas lentamente por su exposición a heparina o heparinasas, o más rápidamente por la acción de plasmina que escinde la región C-terminal para producir un fragmento activo, o uroquinasa. Por consiguiente, el VEGF se hace disponible para las células endoteliales a través de dos mecanismos diferentes: la secreción de isoformas solubles o la escisión proteolítica de isoformas unidas a la matriz extracelular<sup>124,125</sup>.

### 2.4.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL VEGF

Mientras que las diferentes formas de unión y la escisión proteolítica de las isoformas más grandes del VEGF pueden contribuir a la regulación de su actividad, el principal mecanismo de regulación parece producirse a través de la inducción o la supresión de la expresión del gen del VEGF y a la estabilidad de su ARNm. La expresión del gen del VEGF está regulada por varios factores que incluyen la hipoxia, el pH, factores de crecimiento, la transformación celular, hormonas, óxido nítrico (NO), y oncogenes, siendo la hipoxia el factor mejor estudiado. La hipoxia estimula la expresión del gen del VEGF de forma similar a como se estimula la producción de eritropoyetina por la baja tensión de oxígeno. En condiciones de hipoxia, los factores de transcripción inducidos por hipoxia, HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , son estabilizados y transportados al núcleo, donde ejercen una interacción con HIF- $\beta$ . Este complejo se une entonces a una secuencia específica del gen del VEGF denominada elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), que estimula la transcripción del gen del VEGF. La regulación de la expresión del VEGF por la tensión de oxígeno también puede implicar la inhibición del supresor tumoral, la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que parece suprimir la expresión del VEGF en condiciones normales de oxigenación. Se ha sugerido que la VHL también pueda actuar suprimiendo la transcripción del VEGF, o también después de la transcripción; es decir, está involucrado en la degradación del ARNm o de la proteína. En las células en las que la VHL presenta una disfunción, tal como ocurre en la enfermedad de Von Hippel-Lindau, se acumulan grandes concentraciones de VEGF como resultado de su sobreexpresión. Esto da lugar a tumores de células renales muy vascularizados, debido a la estimulación de la angiogénesis por el VEGF. También se ha demostrado que varios factores de crecimiento, entre ellos el FGF, citoquinas y hormonas inducen la expresión del ARNm del VEGF y/o la producción de la proteína VEGF *in vitro*<sup>125</sup>.

### 2.4.2 RECEPTORES DEL VEGF

Los sitios de unión del VEGF fueron identificados inicialmente en la superficie de las células endoteliales vasculares *in vitro* e *in vivo*. El VEGF se une a dos receptores tirosin quinasa (RTKs), el VEGFR-1 y el VEGFR-2; ambos poseen 7 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (Ig), una región transmembrana y un dominio intracelular que tiene actividad tirosin quinasa. El VEGFR-3 es un miembro de la misma familia de RTKs, pero no es un receptor para VEGF sino para VEGF-C

y VEGF-D. Además de estos RTKs, el VEGF interacciona con una familia de correceptores, las neuropilinas. El VEGFR-1, también denominado Flt-1, fue el primer receptor RTK identificado como receptor del VEGF hace más de una década (de Vries y col., 1992). La función precisa de esta molécula sigue debatiéndose, aunque las últimas evidencias indican que la existencia de diferentes hipótesis planteadas sobre su función, puede ser debida, al menos en parte, al hecho de que las propiedades de señalización de este receptor pueden diferir dependiendo del momento de desarrollo del animal y del tipo celular. La expresión del VEGFR-1 está estimulada por la hipoxia, mediante el factor de transcripción HIF-1. Al VEGFR-1 se une el PLGF y el VEGF-B, los cuales no se unen al VEGFR-2, también se une el VEGF con mayor afinidad que al VEGFR-2. El VEGFR-1, sin embargo, tiene sólo una débil actividad tirosin quinasa. Esto, junto con los datos que indican que se pueden demostrar actividades mitogénicas y quimiotácticas del VEGF en células que sólo expresan el VEGFR-2 pero no en células que expresan sólo el VEGFR-1, sugiere que el VEGFR-1 no está directamente implicado en mediar estos efectos del VEGF. El VEGFR-1 parece actuar como un receptor señuelo que regula negativamente los efectos del VEGF sobre el VEGFR-2. Secuestrando al VEGF, el VEGFR-1 reduce el VEGF disponible para unirse al VEGFR-2. Sin embargo, hay pruebas que sugieren que el VEGFR-1 es mediador de la migración de macrófagos inducida por el VEGF y de la supresión de la maduración de células dendríticas. Así que el VEGFR-1 puede estar involucrado en los efectos mediados por el VEGF sobre células distintas de las células endoteliales, tales como los macrófagos. El VEGFR-1 también juega un papel importante en la angiogénesis producida en condiciones patológicas. El gen del VEGFR-1 también codifica para una versión más corta de esta proteína que carece de región transmembrana y de dominio intracelular. La función de esta forma soluble es desconocida, pero parece ser que inhibe la actividad del VEGF. El VEGFR-2 también denominado Flk-1 ó KDR se expresa sobre todo en células endoteliales vasculares, y es el que ejerce principalmente los efectos biológicos del VEGF. Tiene una elevada afinidad por el VEGF, una potente actividad tirosin quinasa y forma homodímeros. El segundo y tercer dominios extracelulares tipo Ig están relacionados con la unión al VEGF, mientras que los dominios 4-7 tipo Ig están involucrados en la dimerización. La unión del VEGF al VEGFR-2 y la posterior homodimerización del receptor son esenciales para la estimulación de la transducción de señales intracelulares inducidas por el VEGFR-2, que es decisiva para la actividad del VEGF. El promotor del gen del VEGFR-2 no posee sitio de unión a HIF-1, lo que sugiere que la regulación positiva de este gen por la hipoxia es indirecta. La estimulación del gen del VEGFR-2 por el VEGF parece estar mediada por la unión del VEGF a este receptor y la activación de rutas de transducción de señales intracelulares. El VEGFR-2 es también un receptor para VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E, aunque la importancia fisiológica de estos factores está peor definida. Las células endoteliales y algunas células tumorales expresan sitios de unión al VEGF diferentes al VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 en su superficie celular, a los que sólo se unen algunas isoformas del VEGF identificaron uno de estos receptores específico de isoformas del VEGF como neuropilina 1 (NRP-1). El otro receptor, la neuropilina 2 (NRP-2) fue identificada debido a su secuencia homóloga con NRP-1. NRP-1 puede unirse a VEGF165, VEGF-B, PLGF-2, y algunas variantes del VEGF-E, mientras que NRP-2 se puede

unir a VEGF145, VEGF165, PLGF-2 y VEGF-C. Cuando NRP-1 se coexpresa en células que poseen VEGFR-2, NRP-1 estimula la unión del VEGF165 al VEGFR-2. Se ha hipotetizado que NRP-1 presenta el VEGF165 al VEGFR-2 de manera que se estimula la transducción de señales mediada por VEGFR-2. Esta unión del VEGF165 a NRP-1 explicaría en parte la gran capacidad mitogénica de esta isoforma frente al VEGF121. Los dominios intracelulares de los NRPs son cortos y no son capaces de transducir señales biológicas de manera independiente mediante su unión a VEGF.<sup>129,130,131</sup>

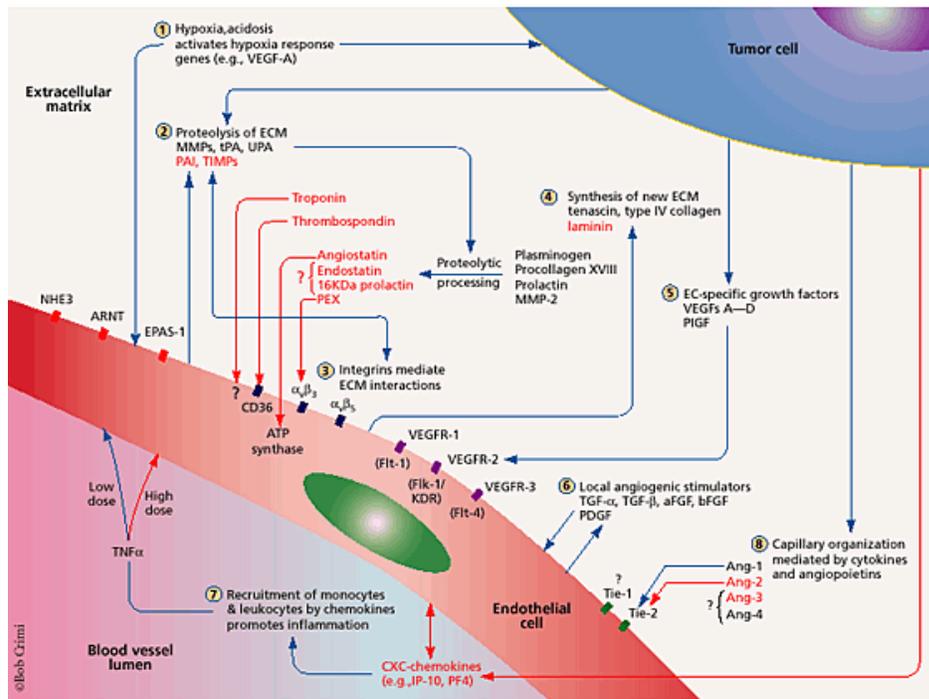


FIG 2 Expresión de los receptores de VEGF

### 2.4.3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Los efectos del VEGF están mediados por la activación de varias rutas intracelulares de transducción de señales después de la unión a los VEGFR. La activación de los VEGFR sigue la misma serie de pasos, en general, que la observada con otros RTKs: unión del VEGF; dimerización del receptor del VEGF; activación de la actividad del RTK; autofosforilación del receptor del VEGF. El receptor activado inicia la cascada de transducción de señales que producen los efectos del VEGF. El VEGFR-1 transduce señales para el crecimiento y la supervivencia de células endoteliales y pericitos, así como para la migración de macrófagos mediante la autofosforilación inducida por ligando y la activación de proteínas transductoras de señales intracelulares. Entre ellas se encuentra la fosfolipasa C (PLCγ1), implicada en la proliferación de células endoteliales mediante la activación de la ruta de la proteína

quinasa de activación mitogénica (MAPK). También se ha descrito la unión de la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) al VEGFR-1 fosforilad. Sin embargo la activación del VEGFR-1 no se relaciona con fuertes respuestas biológicas en modelos de líneas celulares endoteliales. Un exhaustivo estudio de las respuestas celulares a la activación del VEGFR-2 ha identificado, al menos, 46 moléculas de transducción de señales que sufren una fosforilación como respuesta a la unión del VEGF al VEGFR-2, y se ha demostrado, *in vitro*, que el VEGF activa la mayoría de las rutas de transducción de señales identificadas hasta la fecha. Sin embargo, la activación de alguna de estas rutas puede no ser fisiológicamente relevante y es probable que haya diferentes rutas implicadas en diferentes tipos de células. Una de las funciones importantes del VEGFR-2 es la estimulación de la supervivencia y crecimiento celular del endotelio vascular y la promoción de la angiogénesis. La unión del VEGF al VEGFR-2 induce la activación de la PLC $\gamma$  que hidroliza después el fosfatidil inositol difosfato (PIP2) en la membrana plasmática para producir las moléculas de transducción de señales diaciglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). La supervivencia de células endoteliales implica la activación de la PI3K y la ruta de la proteína quinasa B (PKB, Akt) que también regula la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). La eNOS juega un papel predominante en la angiogénesis inducida por VEGF y en la permeabilidad vascular. La PI3K también activa la ruta p70 S6K, involucrada en la proliferación de las células endoteliales, y la proteína Rac de unión a guanosín trifosfato (GTP), implicada en la regularización de la permeabilidad vascular. El DAG está implicado en la activación de la proteína quinasa C (PKC), en particular la isoforma PKC $\beta$ . A continuación la PKC $\beta$  se fosforila y activa la ruta de las MAPK a través de la cascada c-Raf-MEK-ERK estimulando la síntesis de ADN y la proliferación de células endoteliales. Por otro lado, el DAG provoca una mayor perforación de los capilares, lo que a su vez induce una mayor permeabilidad vascular, esto parece producirse mediante la activación de canales de cationes no selectivos, dando lugar a la entrada de iones de calcio. La actividad de quinasas específicas de la familia Src también es esencial para el incremento de la permeabilidad vascular mediada por el VEGF. Otra proteína implicada en el control de la permeabilidad vascular es la p38 MAPK<sup>130,131,132</sup>.

El VEGF induce la migración en las células endoteliales mediante la activación secuencial de Cdc42 y p38 MAPK o la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y Paxilina<sup>132</sup>.

### 2.4.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

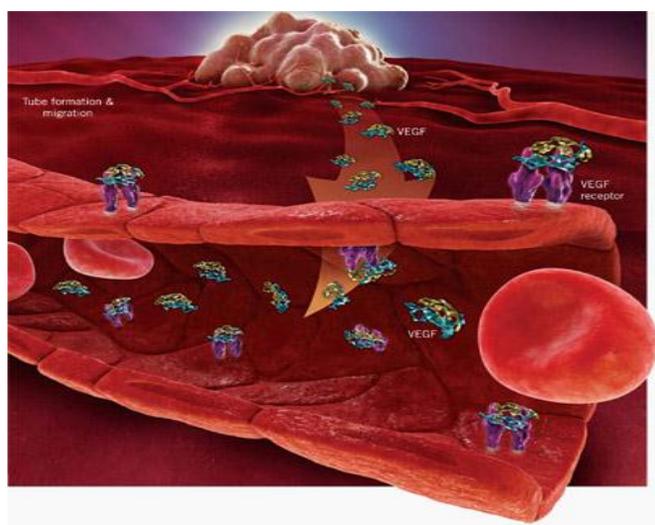
El VEGF tiene cuatro actividades biológicas principales que contribuyen todas ellas

la inducción de la angiogénesis y que han sido estudiadas exhaustivamente:

- Crecimiento y proliferación de células endoteliales vasculares.
- Migración de células endoteliales vasculares.
- Supervivencia de células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis.
- Aumento de la permeabilidad vascular.

- Vasodilatación.

Recientemente, también se ha implicado al VEGF en la linfangiogenesis. Además de estas acciones sobre las células endoteliales, existe cierta evidencia de efectos sobre otros tipos de células. Entre los efectos observados sobre células obtenidas de la médula ósea, se incluyen los siguientes: promoción de la quimiotaxis de los monocitos, inhibición de la maduración de las células dendríticas, aumento de la producción de células B y generación de células mieloides inmaduras. El VEGF también parece estar involucrado en la supervivencia de las células madre hematopoyéticas durante la repoblación hematopoyética<sup>131,132</sup>.



**FIG 3. Señalización por tumor a expresión Del VEGF.**

### **2.5 ANGIOGENESIS EN LA ASCITIS MALIGNA Y DERRAMES PLEURALES POR CARCINOMATOSIS.**

Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que regular puede ofrecer la formación de derrames malignos formas de diseñar modos nuevos y más eficaces de la terapia para el grave problema de ascitis maligna. La etiología de ascitis tenían tradicionalmente se ha atribuido a la obstrucción linfática causada por tumor se extendió a drenar los vasos linfáticos . También ha sido sugirió que podrían contribuir inducida por el tumor angiogenesis para el desarrollo de ascitis maligna. Sin embargo, en 1983, Senger et al. sugirió una alternativa posibilidad. Aisló el factor de permeabilidad vascular (VPF) de ascitis de animales de rodamiento de tumor y la hipótesis de que este factor era secretado por las células de tumor en un modalidad de paracrin, siendo responsable de líquido relacionado con el cáncer . Unos años más tarde, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) fue descubierto como un potente estimulador de la angiogenesis y posteriormente reconoció que era

idéntico al VPF. VEGF es una glicoproteína de kDa de 34–42 altamente conservada, secretada por una gran variedad de tumores humanos. Además, células mesoteliales peritoneal, monocitos/macrófagos, infiltración y derrames malignos, son capaces de producir VEGF. Interactuando con dos de tirosina de alta afinidad de receptores de quinasa (capitán-1 y Flk/KDR-1), que son de forma selectiva expresada en el endotelio vascular, VEGF actúa sobre el endotelio normal y recién inducido por tumor angiogénesis. Angiogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos desde vasculatura preexistente, es un componente esencial de crecimiento de tumor sólido y las metástasis. Ahora es generalmente aceptó que el tumor sólido crecimiento debe ir acompañado por la angiogénesis paraa proporcionar el apoyo vascular necesario para el tumor tenga expansión masiva. Sin embargo, no sólo neovascularización permite mayor crecimiento de los tumores primarios, sino que también proporciona una vía para migrar células del tumor para acceder a la circulación sistémica y asi establecer metástasis a distancia. In vitro y en vivo, VEGF estimula la cascada completa de eventos necesarios para la angiogénesis y se cree que desempeña un papel decisivo en la vascularización de tejido neoplásico. Además de su capacidad para promover la angiogénesis, VEGF también es capaz de marca aumentar la permeabilidad de microvascularización preexistente<sup>131,132</sup>.

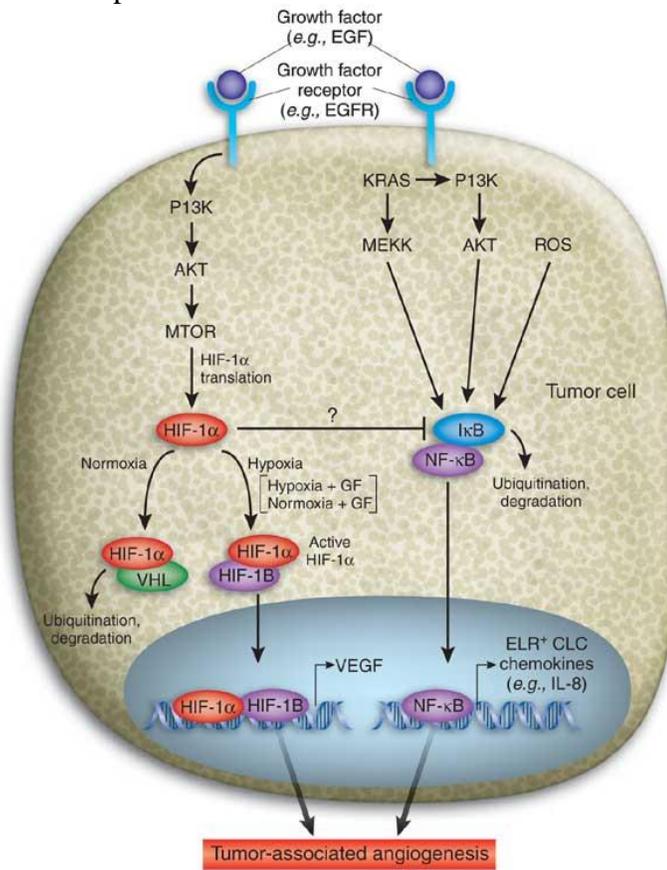


FIG. factores de crecimiento en correlación a sus receptores a nivel de la célula tumoral para la formación de un nuevo vaso sanguíneo.

El VEGF es sobreexpresado en una variedad de tumores que causan ascitis maligna por carcinomatosis peritoneal. La expresión de intratumoral VEGF se correlaciona con mayor potencial metastásico y pobre tasa de supervivencia, entre otros, gastrointestinales como gástrico, colonico y los de, ovario, mama y cáncer de pulmón. En consecuencia, las concentraciones séricas de VEGF, se ha demostrado ser más alta en pacientes con diversos tumores sólidos que en controles normales. Niveles de suero de VEGF correlaciona positivamente con la etapa de la enfermedad. Las concentraciones elevadas de VEGF en la sangre periférica de los pacientes de cáncer también podrían estar asociados en general con pobre supervivencia y la libre de progresión. Los estudios iniciales ya habían indicado que la acumulación de los resultados de la ascitis maligna, en gran parte, de mayor permeabilidad de los vasos de revestimiento peritoneal. Sin embargo, hasta la identificación de VEGF en ascitis maligna, las bases moleculares del peritoneal vascular y la hiperpermeabilidad no había sido descifrados. Más tarde se muestra que la ascitis maligna derivan de desarrollo tumoral en ratones y conejillos de Indias que contienen altas concentraciones de VEGF soluble y la expresión de los niveles de VEGF por las células cancerosas, se ha demostrado que directamente se correlaciona con la producción de células en la carcinomatosis y la producción de ascitis maligna. en el modelo animal. Por otra parte, cuando inyectada en ratones con células tumorales, VEGF aumenta la microvascular permeabilidad de los vasos pequeños preexistentes situado en los tejidos que recubren la cavidad peritoneal. Por otra parte, el volumen total del líquido peritoneal se correlaciona estrechamente con la aparición de VEGF dentro de la ascitis, y se demostró que la proteína VEGF se acumula en los filtración de los vasos sanguíneos que recubren las cavidades peritoneal de ratones con carcinomatosis. El resultados de ello, el VEGF aumenta la permeabilidad de las vénulas y venas pequeñas para las proteínas del plasma con una potencia de 10.000 veces mayor que la histamina en baja nanomolares o picomolar concentraciones. En consonancia con estos datos, la transfección de las células de cáncer renal con ADN VEGF o vectores virales codificación VEGF aumentando la capacidad de estas células para inducir una hiperpermeabilidad peritoneal en la carcinomatosis tas la implantación en ratones. Transfección incluso directa del peritoneo de ratón con VEGF es suficiente para causar una acumulación de ascitis. En conclusión, estos datos permiten que estos hallazgos confirmen que la secreción de VEGF local es responsable, en gran parte, para iniciar y mantener la ascitis asi como el patrón de crecimiento tumoral. En numerosos estudios en humanos, han sido encontrados marcadamente elevaciones en las concentraciones de VEGF en derrames pleurales malignos y ascitis derivados de los pacientes con un gran variedad de tumores sólidos, tales como ovario, gástrico, colorrectal, pancreático, mama y cáncer de pulmón. Por lo general, mucho menor las concentraciones se detectan en aumento de derrames causada por la insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis hepática o infecciones. En un reciente estudio, se analizaron las concentraciones de 21 diferentes citoquinas/quimioquinas simultáneamente analizado en ascitis maligna y aumento. Podríamos muestran claramente que el VEGF una de las citocinas más firmemente relacionadas en ascitis por carcinomatosis, . Las concentraciones de VEGF dentro

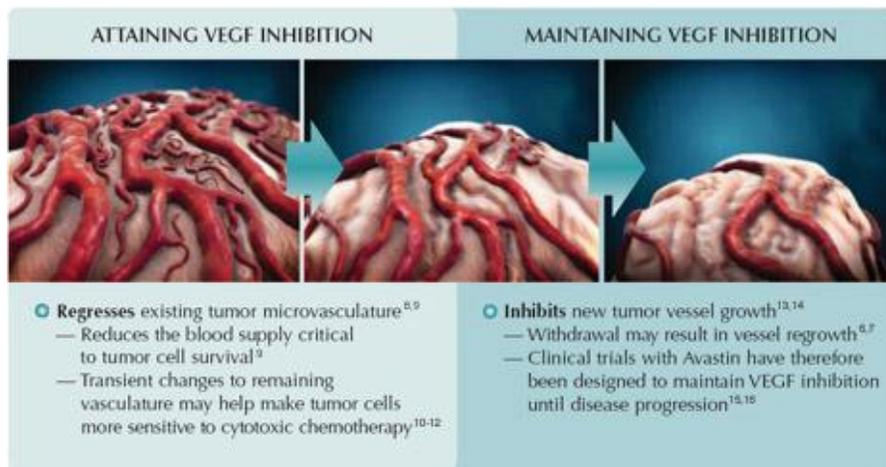
de los derrames y liquido de ascitis fueron siempre superiores a los de los sueros correspondientes de la los mismos pacientes. Curiosamente, el volumen de ascitis maligna se correlación con la concentración de VEGF dentro de la solución y con la intensidad de la expresión de VEGF en los tumores abdominales extraídos de el mismo paciente, que indica la importancia dentro de la cavidad peritoneal o pleural. Por otra parte, las concentraciones de VEGF dentro de ascitis y derrames malignos en humanos se correlacionado con su capacidad para inducir la fuga vascular en un modelo experimental, un efecto que podría bloquearse por tratamiento con un anticuerpo dirigido contra el receptor VEGF Flk-1. Más importante aún, concentraciones de VEGF en ascitis maligna mostraron recientemente para correlacionar con la quimiosensibilidad y representan un predictor independiente de supervivencia libre de progresión y en general en pacientes con cáncer<sup>132,133</sup>.

## **2.6 MANEJO EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DEL VEGF EN LA CARCINOMATOSIS EVIDENCIA PRECLINICA.**

Si VEGF es responsable de la acumulación de líquido y del desarrollo en el medio ambiente de tumores sólidos, entonces deben haber terapias anti-VEGF de ser capaz de influir directamente en el desarrollo ascitis maligna por carcinomatosis y además de poseer un un efecto inmediata antitumoral. Lo que es importante, repetidamente se ha demostrado en in vitro por experimentos que la capacidad de VEGF presente en el sobrenadante de líneas de células de tumor o en ascitis maligna para inducir aumento en la permeabilidad vascular; puede ser neutralizado completamente utilizando un anticuerpo dirigido contra VEGF. Por otra parte, se mostró en un estudio con animales animales por Senger que un anticuerpo anti-VEGF es capaz de bloquear la mayor afluencia peritoneal asociada la presencia de tumor intraabdominal con de secreción de VEGF en células in vivo. Desde entonces, varios estudios han claramente demostró que la aplicación intraperitoneal de anticuerpos anti-VEGF es seguro y conduce a la impresionante y a menudo completo remisiones de la acumulación de líquido local en ratones tras inoculación con diferentes células de carcinoma o sarcoma líneas. Coherente con estos hallazgos, la permeabilidad vascular de microvesículas que recubren la cavidad peritoneal ratones infectados de tumor fue significativamente inferior en los tratados con anticuerpos anti-VEGF en animales que en los controles. Tratamiento de anticuerpos, en menor medida, también inhibe el crecimiento tumor y prolonga la supervivencia de los ratones inoculados con células tumorales. Comparando estudios preclínico de la eficacia, en donde fue visto con los inhibidores de tirosina quinasa dirigidos a receptores VEGF o con un VEGF en líquido, y el bloqueo de receptores de VEGF y después de la infusión intraperitoneal de un Oligonucleótido antisentido de VEG, pero no con convencionales aplicadas la quimioterapia intraperitoneal solo. Curiosamente, el retraso en el crecimiento de tumor inducida por el anti-VEGF por el anticuerpo se atribuye principalmente a la obstrucción del desarrollo de las células y la permeabilidad vascular y no a la inhibición inducida por VEGF de la angiogénesis<sup>122,123,124</sup>.

En este contexto, ha sido la hipótesis de que una mayor permeabilidad vascular dentro del peritoneo hacia el desarrollo de la carcinomatosis puede dar como

resultado una mayor aumento de células mesoteliales en la cavidad abdominal, indirectamente facilitar en el peritoneo la difusión de tumor. A pesar de la evidencia preclínica muy fuerte para una papel obligatorio de VEGF en la formación de la ascitis maligna y para una posible eficacia terapéutica de anti-VEGF las terapias en el ajuste de etapas avanzadas de cáncer con presencia de ascitis , actualmente no hay informes de estudios clínicos que abordar este punto en los pacientes de cáncer. Sin embargo, recientemente, una serie de artículos informes de la pequeña serie de pacientes con derrames malignos tratados fuera de etiqueta con bevacizumab presentada resultados impresionantes<sup>123,125</sup>.



### 2.6.1 INHIBICION DE LA VEGF EN UN ANTICUERPO MONOCLONAL, BEVACIZUMAB.

Bevacizumab es un anticuerpo de monoclonales humanizado recombinante a VEGF compuesto de IgG human las regiones y la determinación de complementariedad de enlace de antígeno regiones de un anticuerpo murino que bloquea el enlace de VEGF humano a sus receptores. Neutralizando la actividad biológica de tumores asociados con el VEGF, bevacizumab tiene la capacidad de reducir la vascularización de tumores, inhibiendo el crecimiento de la malignidad. En numerosos modelos de ratón, bevacizumab ha demostrado claramente inhibición del crecimiento de tumor humano. La administración de bevacizumab en modelos de heterotransplantados de carcinoma de colon, ha demostrado que el resultado en una reducción de la formación de microimplantes y el número de metástasis. Una serie de propiedades que hacen algunos agentes más favorables que otros para la terapia intraperitoneal. Una característica importante podría ser que la droga tiene una actividad en la neoplasia maligna . La eficacia de bevacizumab cuando se usa en combinación con la quimioterapia ha demostrado en varias estudios prospectivos, aleatorios de fase de la III. Por ejemplo, en una fase de ensayo de III en pacientes con metástasis cáncer de colon, bevacizumab en combinación con el estándar quimioterapia se encontró el resultado global más largo y progresión en tiempos de supervivencia libre de enfermedad y mayor tasa de respuesta cuando en comparación con la quimioterapia

más placebo. Debido a que de esto y los resultados de otros ensayos, bevacizumab se ha vuelto ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer colorrectal y se está utilizando en el cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de mama. Además, se está estudiando como parte del esquema de tratamiento en una amplia gama de neoplasias. En primer lugar se informó por Pichelmayer que, además de ser eficaz contra neoplasias malignas, Bevacizumab puede ser activa en el tratamiento sintomático de la ascitis maligna. Después de su observación de una respuesta marcada al tratamiento con bevacizumab en un pacientes con derrame pleural benigno, decidieron aplicar una dosis única de bevacizumab i.v. a 15 mg/kg para dos pacientes con ascitis maligna causada por cáncer colorrectal y adenocarcinoma de origen desconocido. Encontraron, en ambas pacientes, en los cuales previamente se realizaba paracentesis por lo menos cada dos semanas, el tratamiento con bevacizumab era segura y altamente exitosa. Observaron reducciones significativas en volumen de ascitis en una interrupción de repetición de paracentesis. Además, ambos pacientes tuvo una marcada disminución en sus niveles de plasma VEGF Después del tratamiento. De acuerdo con estas primeras observaciones, informó de la aplicación i.v. de bevacizumab (15 mg/kg de cada 3 semanas) a cuatro pacientes fuertemente pretratadas con cáncer de ovario de etapa final a fin de paliar ascitis sintomática. En todos los pacientes de cuatro, la repición de paracentesis podría suspenderse debido dramáticamente reducción de los niveles de la ascitis después de la iniciación de la terapia con bevacizumab<sup>131</sup>.

En una publicación muy reciente, informó Hamilton sobre el tratamiento de un paciente de 88 años de edad con ascitis refractaria de cáncer de ovario, un estado funcional muy pobre, y severa ascitis sintomática se realiza la paracentesis y trata al paciente con dos posteriores dosis (5 mg/kg) de bevacizumab intraperitoneal, con una mejoría dramática en su ascitis y la calidad de su últimas semanas de vida. La mayor serie de pacientes tratados con bevacizumab intraperitoneal fue presentada recientemente por el Shami et al, que evalúa la seguridad y eficacia de la administración intraperitoneal de bevacizumab (5 mg/kg cada 4 semanas) para un total de nueve pacientes con ascitis refractaria resultante de colon, mama, de cáncer uterino, o de ovario. Impresionante, la ascitis maligna se resolvió después de un sencillo dosis intraperitoneal en todos los pacientes tratados, sin reaccumulation o Repitadas paracentesis, durante un período de observación media de 2 meses. Además, no se observaron ningún evento adverso de 2-5 de grado<sup>132</sup>.

### 3. RATONES DESNUDOS ATIMICOS.



La especie animal más utilizada en experimentación científica en la actualidad es el ratón (*Mus musculus*). Esto se debe principalmente no solo a sus características reproductivas, su tamaño y la facilidad de manejo, sino también a que su genoma es totalmente conocido. Esto último ha permitido el desarrollo de modelos animales que pueden reproducir características específicas o enfermedades del hombre y de los animales convirtiéndose en reactivos biológicos sobre los cuales se pueden extrapolar los resultados de las investigaciones. Actualmente la producción de modelos murinos constituye una de las temáticas de vanguardia dentro de la ciencia de los animales de laboratorio<sup>135</sup>.

En el ratón existen más de 4000 genes que están asignados a localizaciones específicas, muchos de los cuales fueron identificados, debido a que originan mutaciones espontáneas que producen características físicas distintivas. Los ratones mutantes que portan una mutación simple se han convertido en modelos animales importantes para su utilización en la experimentación científica. Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada *nude* (*nu*). Este alelo mutante homocigoto recesivo pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11 y aparece por primera vez en el año 1966 en una colonia exocriada de ratones en un laboratorio en Glasgow, Escocia. Luego, en el año 1968, se descubre que el ratón *nude* homocigoto, además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo, tenía 20 característica que le dio el nombre a la mutación, carecía de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotransplantados. El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo de animal de experimentación inmunodeficiente<sup>135,136</sup>.

#### OTRAS CARACTERISTICAS IMPORTANTES

Los ratones heterocigotas (+/*nu*), son fenotípicamente normales e inmunocompetentes, mientras que los homocigotas para el gen *nude* (*nu/nu*) son los inmunocomprometidos. Además de su deficiencia de linfocitos T, tienen un

complemento normal de linfocitos B dependientes de la médula ósea, por lo tanto, estos animales se convirtieron en una herramienta excelente para estudiar el papel del timo en la diferenciación linfocitaria y para realizar investigaciones sobre las funciones de las células B, las interacciones con otras células y para estudiar la actividad de células inmunes como las *Natural Killer* (NK) que aparecen en niveles elevados junto con los macrófagos<sup>136</sup>.

Los ratones *nu/nu* si bien muestran un fenotipo desnudo, pueden presentar histológicamente escasos folículos pilosos normales y también algunos pelos finos. Cabe aclarar que existen varios genes mutantes que producen el fenotipo desnudo: *nude*, *naked*, *hairless*, *rhino*; estos genes mutantes no se deben confundir uno con el otro, por lo cual los términos ratón *nude* y ratón sin pelo no se deben usar indistintamente. Los roedores inmunodeficientes son modelos indispensables para las investigaciones biomédicas en estudios de oncología, inmunología, enfermedades infecciosas, estudios del sistema inmune, rechazo de tejidos transplantados, infecciones, cáncer y crecimiento de tumores<sup>135,137</sup>.

### 3.1 RATON DESNUDO EN ESTÚDIOS ONCOLOGICOS.

El descubrimiento del ratón *nude* fue un punto de inflexión sumamente importante para la investigación del cáncer, debido a que permitió el estudio de los tumores humanos *in vivo*. El primer trasplante exitoso de un tumor maligno humano fue en el año 1969. Se debe considerar que antes de la aparición de la mutación que dio lugar al ratón *nude*, los tumores humanos se transplantaban y crecían en sitios, tales como los abazones de los hámsters<sup>140</sup>.

Dentro de las investigaciones en el campo de la oncología para las cuales se han utilizado estos ratones como modelo se deben resaltar los hallazgos obtenidos en quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, interferones, interleuquinas y pruebas de carcinogenicidad entre otros<sup>143</sup>.

### 3.2 SISTEMAS DE CRÍA

Las formas más frecuentes que se utilizan para reproducir estos animales son:

#### 1.-Apareamiento de heterocigotas (+/*nu*):

Este tipo de cruzamiento entre hembras y machos heterocigotas permite obtener una filial 1 (F1) en donde el porcentaje entre fenotipos mutantes *nude* y normales, es decir con pelo, sea de 1:3. Debido a que los heterocigotas son inmunocompetentes y su fertilidad es normal; son fáciles de mantener como colonia saludable. Sin embargo, este sistema tiene dos desventajas:

- a)- La producción de ratones *nu/nu* es baja.
- b)- Los animales de fenotipo normal producidos en este sistema pueden ser +/*nu* ó +/+; estos dos fenotipos no se pueden distinguir excepto por apareamientos o técnicas moleculares<sup>141</sup>.

2.- Apareamiento de hembras heterocigotas *nu/+* con machos homocigotas recesivos *nu/ nu*. Es el sistema reproductivo que más se utiliza debido a que en la F1 el porcentaje de ratones de fenotipo *nude* respecto de los normales es 1:1. Además tiene la ventaja de que todos los ratones normales son heterocigotas<sup>142</sup>.

3.- Apareamiento de homocigotas recesivos *nu/un* A veces se pueden reproducir apareando hembras y machos *nu/nu*, pero aunque toda la F1 resulta con fenotipo *nude*, es un tipo de cruzamiento que no es eficiente debido a la baja fertilidad de las hembras homocigotas *nude* y a su capacidad casi nula para amamantar a las crías, de manera tal que es probable que se fracase si se aplica este sistema<sup>143</sup>.

Las colonias de ratones *nude* deben someterse a un programa de controles microbiológicos exhaustivos que permitirán corroborar la ausencia de contaminaciones. Estos incluyen a los animales, el ambiente y a los insumos.

Es indiscutible el importante progreso que se ha producido en el desarrollo de las investigaciones en las cuales se ha usado como modelo animal al ratón *nude*. El papel que cumplen estos animales como modelo de inmunodeficiencia continuará vigente en las investigaciones biomédicas, especialmente en aquellas enfocadas al tratamiento, prevención, comprensión o estudio del cáncer.

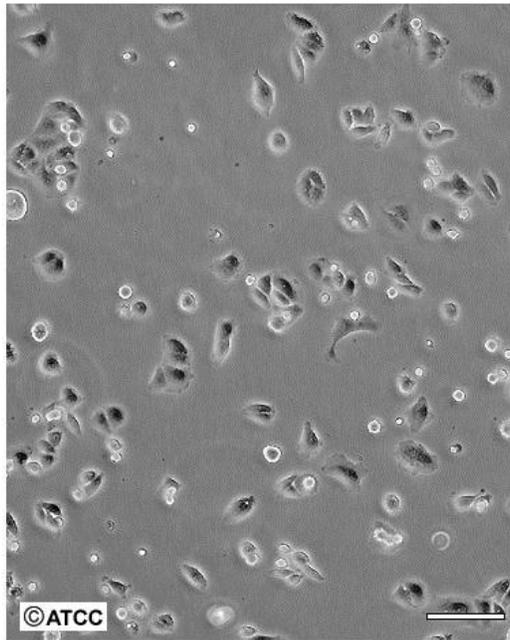
#### 4. CELULAS SW480

La línea celular SW-480 es una línea continua heterogénea de humanos de células de cáncer epitelial de adenocarcinoma colorectal, desarrolladas por el Instituto Sloan-Kettering de Investigación del Cáncer, provenientes de un hombre caucásico de 51 años con un crecimiento en monocapa.

Esta línea celular es negativa para CSAP y el antígeno de colon 3. Son positivas para queratina de la tinción con inmunoperoxidasa, presentan una mutación en el codón 273 del gen p53. Expresan niveles elevados de proteína p 53 y es una línea positiva para la expresión del c-myc, k-ras, ras-H, N-ras, myb, por análisis y oncogenes.

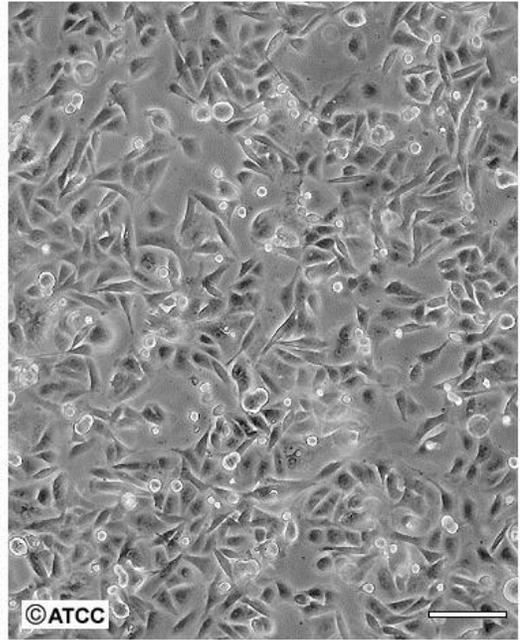
Propagación: el medio base para esta línea celular es ATCC fórmula de Medio Leibovitz L-15 agregando suero fetal bovino al 10% pero también es muy utilizado con buenos resultados el medio DMEM F-12.

ATCC Number: **CCL-228**  
Designation: **SW 480**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Al observar las colonias de células SW-480 al microscopio, es evidente, incluso mediante una inspección visual que las células son heterogéneas. Como resultado, a lo largo de los años las características de las células usadas en los laboratorios de diferentes partes del mundo se han ido distanciando de manera significativa, lo que hace difícil comparar los resultados entre laboratorios. [4]

Las Células SW-480 son una de las células de carcinoma colorectal más comúnmente utilizadas no como células individuales, sino como una confluencia monocapa en una inserción del cultivo de células de filtro. Cuando se cultivan en este formato, las células se diferencian para formar una monocapa de células epiteliales polarizadas que proporciona una barrera física y bioquímica con el paso de iones y moléculas pequeñas. El SW-480 monocapa es ampliamente utilizado en las investigaciones y tratamientos por la industria farmacéutica.

#### CELULAS SWIP-2.

Las células SWIP-2 son células desarrolladas por Globa Biotherapeutic, SA. CV. Con bases celulares en las células SW-480 tras 5 años de estudios. Para desarrollar una cepa mutada en ratones nude, con el fin de obtener características patogénicas acentuadas, con mayor agresividad y eficacia para causar enfermedad peritoneal conservando con las mismas características de proliferación que las células SW-480.

## **5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Cuáles es la respuesta tumoral, los cambios histológicos y la sobreexpresión del VEGF en ratones desnudos con carcinomatosis peritoneal de cáncer de colon; ocasionados con el manejo de quimioterapia hipertérmica perioperatoria, antiangiogénico intraperitoneal normotérmico perioperatorio y la hipertermia intraperitoneal perioperatoria?

## **6. JUSTIFICACION.**

A pesar de que la técnica de quimioterapia intraperitoneal hipertérmica ha sido usada en la terapia de cáncer en humanos, en ensayos clínicos, las poblaciones humanas son muy heterogéneas y las diferencias potenciales en modelos animales son menores.

En la actualidad no existe un consenso de cual es el fármaco con mayor eficacia antitumoral y menor morbilidad, esto debido a varias razones: la gran heterogeneidad en los estudios clínicos, la diversidad de fármacos utilizados, las dosis administradas y las diferentes técnicas utilizadas además de ser neoplasias diversas y por último, por los tratamientos recibidos previamente o procedimientos quirúrgicos diversos cuales son los agentes quimioterápicos más eficaces que logran mayores cambios en la cavidad peritoneal y órganos intra-abdominales en pacientes con carcinomatosis ocasionados por la quimioterapia intraperitoneal hipertérmica en modelo.

La carcinomatosis peritoneal una vez establecida sobreexpresa VEGF aumentando la angiogénesis, la permeabilidad vascular el aumento del tamaño tumoral, como su posibilidad de extensión locoregional y metastásica, impactando en el avance y progresión de la enfermedad, tanto en sobrevida.

Por lo anterior, consideramos identificar y evaluar factores pronósticos y/o predictivos relacionados con angiogénesis; Como la sobreexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y su modificación, así como los cambios tumorales en la cavidad peritoneal y órganos intraabdominales con carcinomatosis peritoneal en un modelo comparativo entre manejos de elección. En ratones nude implantados intraperitonealmente con células SWIP-2 y siendo manejados a base de quimioterapia intraperitoneal hipertérmica perioperatoria; Hipertermia intraperitoneal perioperatoria y antiangiogénico intraperitoneal normotérmico perioperatorio.

## **7. HIPOTESIS NULA**

En la carcinomatosis peritoneal de cáncer de colon manejada con quimioterapia intraperitoneal perioperatoria; hipertermia intraperitoneal perioperatoria y antiangiogenico intraperitoneal perioperatorio. No existen diferencias en la respuesta clínica tumoral, los cambios histológicos, la modificación de la sobreexpresión de VEGF y la sobrevida, después del tratamiento.

## **8 HIPOTESIS ALTERNA**

En la Carcinomatosis peritoneal de cáncer de colon manejada con quimioterapia intraperitoneal perioperatoria; hipertermia intraperitoneal perioperatoria y antiangiogenico intraperitoneal perioperatorio. Si existen diferencias en la respuesta clínica tumoral, los cambios histológicos y la modificación de la sobreexpresión de VEGF y la sobrevida, después del tratamiento.

## **9. OBJETIVO GENERAL.**

Demostrar las diferencias en los manejos en ratones nude con carcinomatosis peritoneal implantados con células de cáncer de colon, comparando la quimioterapia hipertermica de elección, anticuerpo monoclonal antiangiogénico e hipertermia; todos intraperitoneal perioperatoria. Demostrar los cambios clínicos, histológicos, tumoral, expresión de VEGF y sobrevida.

### **9.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Demostrar que el manejo de quimioterapia hipertérmica perioperatoria con 5 – FU en un modelo experimental con ratones nude con carcinomatosis, implantados con cáncer de colon ocasionan cambios clínicos, histológicos, tumorales, en la sobreexpresión del VEGF y en la sobrevida.

·  
Demostrar que el manejo con bevacizumab intraperitoneal perioperatoria en un modelo experimental con ratones nude con carcinomatosis, implantados de cáncer con colon ocasionan cambios clínicos, histológicos, tumorales, en la sobreexpresión del VEGF y en la sobrevida.

·  
Demostrar que el manejo de la hipertérmica perioperatoria en un modelo experimental con ratones nude con carcinomatosis implantados de cáncer de colon ocasionan cambios clínicos, histológicos, tumorales, en la sobreexpresión del VEGF y en la sobrevida.

## 10. TIPOS DE ESTUDIO.

DISEÑO: Experimental.

- Prospectivo.
- Experimental
- Descriptivo.
- Transversal.
- Analítico.

## 11. DEFINICION DE UNIVERSO.

Ratones nude implantados inoculados intraperitonealmente células SWIP-2 probocando carcinomatosis peritoneal.

Se conforma cuatro grupos;

- 1) Grupo control:
- 2) Grupo quimioterapia hipertérmica con 5- Flurouracilo perioperatoria.
- 3) Grupo anticuerpo bevacizumab normotermico perioperatorio.
- 4) Grupo hipertermia perioperatoria.

## 12. CRITERIOS.

### 12.1 CRITERIOS DE INCLUSION.

- Ratones nude sanos con carga bacteriana adecuada.
- peso de 20-25 gr.
- De 7- 8 semanas de edad.
- Implantación peritoneal exitosa.
- Observación macroscópica de lesiones peritoneales (carcinomatosis)

### 12.2 CRITERIOS DE ELIMINACION.

- Ratones nude sin implantación peritoneal exitosa por células cancerígenas.
- Ratones sin observación macroscópica de lesiones peritoneales (carcinomatosis).
- Ratones nude que fallecieron durante el proceso anésteico y/o quirúrgico inmediato.

### **13. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.**

Se seleccionaron ratones nude sanos con carga bacteriana adecuada divididas en los grupos aleratoriamente inoculadas con células SWIP-2 provocando carcinomatosis peritoneal.

### **14. VARIABLES.**

#### **14.1 VARIABLES INDEPENDIENTES**

- a) Grupo control.
- b) Quimioterapia hipertermica intraperitoneal perioperatoria con 5-Fluoruracilo.
- c) Bevacizumab normotermico intraperitoneal perioperatorio.
- d) Hipertermia intraperitoneal perioperatoria.

#### **14.2 VARIABLES DEPENDIENTES**

- a) Perímetro abdominal
- b) Líquido de ascitis.
- c) Índice de carcinomatosis.
- d) Actividad física
- e) Ingesta de alimentos y bebidas
- f) Sobrevida posterior a tratamiento.
- g) Infiltración por tumor en histología
- h) Grado de necrosis tumoral
- i) Sobreexpresión de los receptores al VEGF.

## 15. MATERIALES Y METODOS

### 15.1. MANTENIMIENTO Y CUIDADOS DE RATONES NUDE.

Por su condición de inmunodeficientes, los ratones *nude* deben obligatoriamente mantenerse en ambientes en los que se hayan instalado barreras sanitarias estrictas. La categoría microbiológica de los *nude* debe ser la de animales SPF (*Specific Pathogen Free*), esto significa que tendrán su flora intestinal normal pero deberán estar libres de todos aquellos microorganismos específicos capaces de causar infecciones. En condiciones convencionales pueden sobrevivir entre 14 y 30 días. El bienestar de estos animales depende, en gran medida, del sistema de alojamiento que se elija y del diseño y control del ambiente, factores que son críticos para la producción y el mantenimiento del *nude*. Además se deberán tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- 1.- El ambiente físico diseñamos y operamos de manera tal que nos permitio establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos. No solamente se los puede mantener en habitaciones acondicionadas, utilizamos cabinas aisladoras con microaisladores.
- 2.- La estabilidad ambiental se logro mediante un buen diseño del control de la temperatura, de la humedad relativa como la estricta introducción a el area mediante equipo quirurgico esteril en todo tiempo.
- 3.- Las áreas de servicios tienen que funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior. Estas fueron diseñadas específicamente en el lavado y esterilización de insumos como fueron, campos esteriles, batas esteriles, cajas microaisladoras esteriles, además se debe contar con un depósito de equipamiento, de alimento y lechos o camas.
- 4.- Las cajas de microaislantes contenian, comederos y bebederos se encuentran esteriles como se aplican de acuerdo con las normativas internacionales en cuanto a su material, dimensiones y diseño; con el objeto de brindar el máximo confort a los ratones y de facilitar en forma eficiente su limpieza y esterilización. La instalación de barreras absolutas brindo la seguridad necesaria para evitar contaminaciones.

El alimento se esterilizo (sometido a autoclave en gas ) por que la humedad que proporciona el autoclave en vapor desnaturaliza la proteínas. El agua de bebida también es esteril. El ratón desnudo requirieron una temperatura más elevada, manteniéndola entre 25 +/- 1° C.. Un fotoperíodo uniforme luz/oscuridad de 14–10 horas respectivamente.



### **ESPACIO FÍSICO.**

Se identificó un espacio físico domiciliario el cual se adecua conforme a las necesidades para el cuidado y control de los ratones nude, cuenta con una superficie de 8 metros cuadrados se realiza un recubrimiento de unicel de espesor 4 cm con una longitud para cada tabla de 1.50 m. De altura por 1.22 m. De ancho, colocándolo en toda la superficie de paredes confinándole una superficie continua lisa en lo largo de la habitación, con este método y utilizando al unicel como aislante térmico se evitan modificaciones térmicas abruptas de más de 1 a 2 grados, teniendo un control de temperatura mediante termómetro fijo en habitación y manteniendo temperaturas de 36-38 grados centígrados continuos con monitorización horaria de la temperatura.

Dentro de la habitación se deja una mesa quirúrgica y de exploración así como 4 gabinetes de reservorio y almacenaje de alimentos, material estéril, agua estéril, y camas estériles para los ratones nude.

El biotério se maneja con horarios de luz y oscuridad los que iniciaban a las 8:00 hrs y terminaban a las 20.00 hrs. Para mantener una relación de 1:1 Luz-oscuridad como se estableció en el cuidado de los ratones nude .

## 15.2. BIOTERIO



### 15.2.1 ANTECEDENTES:

Luego de haber realizado una escrupulosa búsqueda de lugares ya determinados como biotérios, donde La búsqueda dependia de La normatividad y los cuidados propios de los ratones nude en La ciudad de aguascalientes en los que resaltan El biotério general de La universidad y El biotério Del área de ciências básicas de La universidad. Los cuales no cuentan con instalaciones necesarias para El cuidado y seguimiento de este tipo de ratones. Motivo por El cual se decide La realizacion de un espacio domiciliário que cuente con La mayor parte de lãs especificaciones normadas para El cuidado y control de estos ratones.

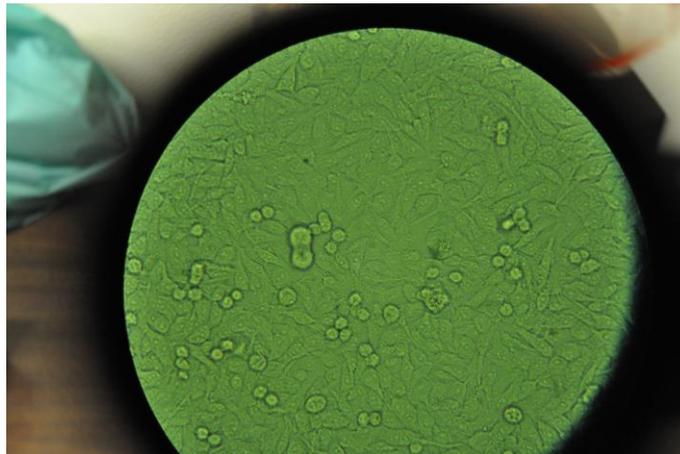
### 15.2.2 ESTERILIZACION DEL BIOTÉRIO.

El modo de ingreso al biotério es mediante ropa quirurgica, botas, cubrebocas y gorro esteriles. El método de esterilizacion del área física se realizo Manuel y mediante aspercion. Diariamente a las 10:00 hrs manejando una solucion de hipoclorito al 2% em un total de 100 ml diluído em 6 lts de água comun. Se coloca em aspersor manual cubriendo com dicha solucion La superficie completamente dejando reposar por 15 minutos, posterior se prepara solucion esterilizante alcazide a una diluacion de 20 cc em 1 lt de água comun colocando em La totalidad superficie cubriendo la totalidad del interior del biotério termiando con La colocacion de hipoclorito em La misma solucion em piso.

### **15.3. CULTIVOS CELULARES LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA Y MORFOLOGIA DE LA UAA.**

Mediante El apoyo de la Universidad Autonoma de Aguascalientes atravez Del laboratorio de Neurofisiologia y morfologia en colaboracion con el personal adscrito a dicha área, Se realizaron los procesos descritos mas adelante en su totalidad como fue, El prestamo de áreas físicas y equipo de alta tecnologia para La realizacion de este proyecto.

#### **15.3.1 CÉLULAS SWIP-2**



#### **15.3.2 ANTECEDENTES CÉLULAS SWIP-2.**

Las Celulas SWIP-2 utilizados en esta investigacion fueron proporcionadas y con el apoyo Global Biotherpeutic SA de CV. en las instalaciones del Tecnologico de Monterrey Campus DF.

Global Biotherapeutic es una empresa de reconocimiento mundial como principales investigadores en el área de tecnologia biomedica, antecede un estudio de investigacion bien desarrollado y demostrado con células SWIP-2 modificadas. La cuales mediante La inoculacion intraperitoneal de células SWIP-2 se presenta enfermedad peritoneal como carcinomatosis peritoneal de gran agresividad y con una capacidad de provocar enfermedad de 100% como carcinomatosis peritoneal de cancer colorectal, sobre ratones del tipo nude.

Global Biotherapeutic nos proporciono 2 con celulas SWIP-2 para La realizacion y el desarrollo de este proyecto.

### **15.3.3 MÉTODO DE DESCONGELACIÓN DE VIAL CON CÉLULAS SWIP2.**

Consideraciones previas a entrar a cultivo

- a) Tomar en cuenta el material y tiempo necesario para llevar a cabo el procedimiento a realizar.
- b) Encender la campana de 15 a 20 minutos previos a iniciar a trabajar y verificar que se encuentre limpia, se esteriliza parcialmente saneando con Ho2 en toda la superficie.
- c) Se tempera en incubador de Co2 a temperatura de 38 grados centigrados durante 15 minutos previos a procedimiento el cultivo a preparado de tipo EMEM-D ( ver mas adelante) como el PBSA.
- d) Soluciones salinas deberá estar a temperatura ambiente antes de iniciar a trabajar.
- e) Evitando la contaminación externa saliendo y entrando del cuarto de cultivo.
- f) Entrar con manos aseadas, evitando introducir pulseras, anillos, relojes.
- g) Procurar utilizar batas limpias y/o batas desechables.

Se realizaron los dos tipos de procedimiento para el descongelamiento del vial en donde se encuentra nuestra línea celular SWIP-2 describo cada uno de ellos.

#### **DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS (PROCEDIMIENTO LARGO)**

1. Una vez conocida la densidad celular contenida en el vial, se selecciona la caja de cultivo adecuada iniciando con una medida T25.
2. Adicionamos medio de cultivo DMEM-D suficiente para cubrir la superficie de la caja y se coloca en incubador.
3. Se selecciono el vial que contiene la línea celular CaCo-2 a descongelar y se sanitiza con etanol.
4. Se coloca el vial en medio ambiente y posterior al inicial la descongelación se toma entre ambas manos para temperar hasta lograr que el contenido del vial sea completamente líquido para su manipulación con las pipetas.
5. Se abre el vial con mucho cuidado, evitando tocar los bordes de la boquilla o interior del mismo.

6. El contenido del vial se toma mediante pipeta automática y se resuspende, luego se coloca en la caja que contiene el medio de cultivo EMEM-D lentamente evitando turbulencia para disminuir el daño celular de este procedimiento.
7. se sanitiza la caja antes de ser introducida a la incubadora y se realiza una distribución del contenido de la caja con movimientos norte-sur y este-oeste
8. Se introduce en el incubador Co2 a flujo continuo, esperamos de 3 a 4 h y verificamos al microscopio que se hayan adherido las células antes de realizar un nuevo cambio del medio de cultivo DMEM-D



### **DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS (PROCEDIMIENTO CORTO)**

1. Una vez conocida la densidad celular contenida en el vial, se selecciona la caja de cultivo adecuada iniciando con una medida T25.
2. Adicionamos medio de cultivo DMEM-D suficiente para cubrir la superficie de la caja y se coloca en incubador.
3. Se selecciono el vial que contiene la línea celular SWIP-2 a descongelar y se sanitiza con etanol.
4. Se coloca el vial en medio ambiente y posterior al inicial la descongelación se toma entre ambas manos para temperar hasta lograr que el contenido del vial sea completamente líquido para su manipulación con las pipetas.
5. Se abre el vial con mucho cuidado, evitando tocar los bordes de la boquilla o interior del mismo.
6. Se resuspende el contenido del vial y se coloca en un tubo cónico de 15 mL.

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

7. Adicionamos PBSA 1X a un volumen de 3 cc con el propósito de lavar las células.
8. Centrifugar a 130- 150 g aproximadamente 1250 rpm durante 5 minutos posterior se desecha el sobrenadante y se repite el procedimiento por 3 para estar seguro las células se encuentran totalmente lavadas
9. Resuspendemos el contenido del tubo cónico y colocamos en la caja predeterminada que contiene el medio de cultivo DMEM-D previamente temperado.
10. Sanitizamos la caja antes de ser introducir a la incubadora.
11. Distribuimos el contenido de la caja con movimientos norte-sur y este-oeste.
12. Esperamos de 3 a 4 h y verificamos al microscopio la adhesión celular.

En el momento el que se realiza el lavado celular y la del numero total de las celular realizamos una licuota para realizar un conteo de celularidad asi como la viabilidad del cultivo ya que un cultivo con células muertas de mas del 50 % tiene un porcentaje alto de fracaso y en ese caso es necesario el descongelar un nuevo vial y repetir los pasos previos.

Se realiza la licuota en 100 mlts y utilizando azul de meti y posteriormente se coloca en la cama de New Bawer para realizar el conteo total de células vivas y muertas dando un conteo inicial de células vivas de 3% de nuestro cultivo y una mortalidad del 97%, sin embargo se decide proseguir un par de días con el cultivo y se determina la perdida del mismo.

Se realiza descongelación de un segundo y ultimo vial el cual en teoría deberia de contener 1,000,000 de células al momento de realización de los pasas de descongelación y sacar nuevamente la licuota y al verla al microscopio con la cámara de New Bawer el nuevo conteo arrojo que el vial contenía 400,000 celulas y que vivas se encontraban solo 80,000 una mortalidad del 65% debido a que correspondía al ultimo vial decidimos su progresión y en esta ocacion y a la revisión a las 4 hrs, se encontraban la mayor parte de estas células fijas en el fondo de la caja T-25. Motivo por el cual proseguimos con el cultivo de células SWIP-2.

### **15.3.4 CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE CÉLULAS SWIP-2.**

Una vez que se realiza la revisión a las 4 hrs posterior al descongelamiento de las células se verifica que estas se encuentren en su gran mayoría adheridas a la caja (por propiedad de estas células) se colocan en un incubador de Co2 de flujo continuo a 5 lts por minuto y se aguarda 24 hrs, para realizar una nueva observación bajo a microscopio de luz, con el fin de ver la celularidad el índice de propagación, una vez que el medio de cultivo EMEM-D se coloración inicial rosa-naranjado es necesario el cambio de medio de cultivo con la técnica siguiente:

### **15.3.5 PROCEDIMIENTO PARA CAMBIO DE MEDIO DE CULTIVO**

Consideraciones previas.

- h) El módulo de flujo laminar, deberá estar sanitizado.
- i) Las soluciones salinas y el medio de cultivo deberán estar a temperatura ambiente o a 37 °C al ser utilizadas.

Cambio de medio de cultivo

9. Se retirar el medio de cultivo agotado de la caja de cultivo.
10. Se adiciona un volumen suficiente de PBS 1X para cubrir la superficie de la caja de cultivo.
11. Distribuir la solución salina agregada a la caja de cultivo con el fin de lavar la superficie de la monocapa.
12. Retirar la solución salina de la caja de cultivo.
13. Agregar a la caja de cultivo un volumen suficiente de medio de cultivo de trabajo.

## **TÉCNICA DE DESPEGAMIENTO Y CAMBIO DE CULTIVO DE CAJA DE CÉLULAS SWIP-2.**

Consideraciones previas.

- a) La confluencia celular en la caja de cultivo se realiza cuando teníamos una confluencia no menor de 80%.
- b) Todas las soluciones salinas y medio de cultivo se temperan en incubadora a temperatura de 38 grados C. antes de iniciar a trabajar.

Despegado de células.

1. Se retira el medio de cultivo agotado de la caja de cultivo.
2. Se lava con un volumen suficiente de aproximadamente 15 ml de PBSA por la superficie de la caja de cultivo.
3. Se adiciona un volumen suficiente de una solución de PBSA/EDTA/TRIPSINA o MEDIO/EDTA/TRIPSINA al 0.5% con fin de cubrir la superficie de la caja de cultivo.
4. Se Incuba la caja de cultivo a 38 °C el tiempo suficiente para desprender y disgregar la monocapa de células.
5. Se ayuda a disgregar el contenido de la caja de cultivo con golpes suaves; si es necesario, se incuba por más tiempo a 38 °C. Se tiene que observar constantemente al microscopio el estado de las células, con el fin de evitar daño.
6. Para la inactivación de el efecto de la tripsina sobre las células, se adicionando 5 mL del medio de cultivo DMEM-D

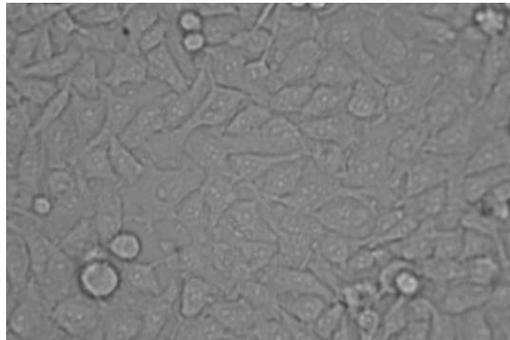


FIG. Celulas Caco-2 adheridas al fondo de la placa. Se observa en un segundo plano celular redondeadas correspondientes a células en flotación.

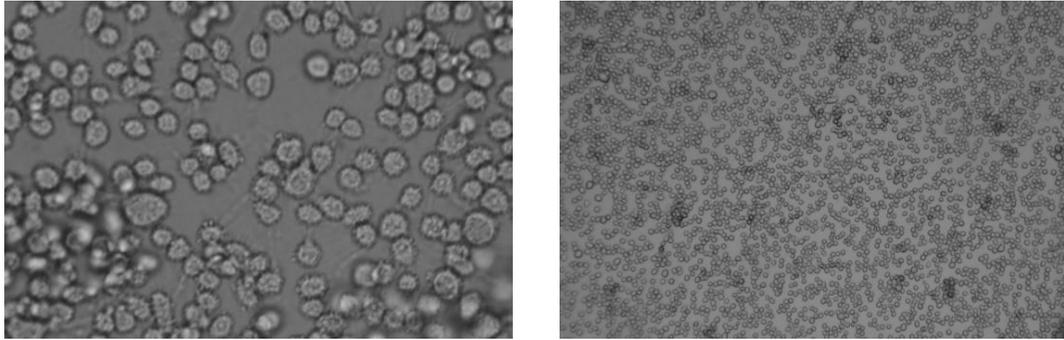


FIG. a) Celulas SWIP-2 una vez vertida la tripsina se muestran redondeadas correspondiendo a células despegadas y en un segundo plano células en flotación 40x. mismas células sin adherencias de las células a la caja de cultivo posterior a la tripsinizacion 10x.

7. Se colecta la suspensión celular en un tubo cónico de 15 mL.
8. Posteriormente se centrifuga a 130- 150 g o bien a 1250 rpm durante 5 minutos a continuación se desecha el sobrenadante.
9. Se adicionar PBS 1X a un volumen de 3 cc con el propósito de lavar las células y centrifugar como en el paso anterior

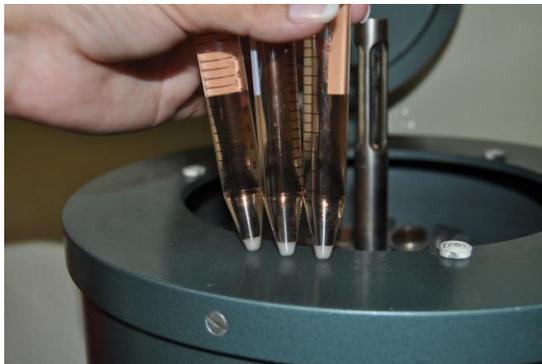


FIG. Se muestra el total del Pellep de células Caco-2, después de ser centrifugadas.

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

### A. Propagación de células.

1. Seguir el procedimiento para despegar células.
2. Se resuspende el contenido del tubo cónico y colocarlo en la(s) caja(s) que contiene(n) medio de cultivo.
3. Se sanitizan la(s) caja(s) antes de ser introducida(s) a la incubadora.
4. Distribuimos el contenido de la(s) caja(s) con movimientos norte-sur y este-oeste.
5. Después de unas horas verificar al microscopio que las células estén adheridas.

### B. Propagación de células controlado.

1. Seguir el procedimiento para despegar células.
2. Resuspender el contenido del tubo cónico en 5-10 mL de medio de cultivo en uso.
3. Tomar 50 uL de la suspensión celular y un volumen igual de una solución 1X de azul de tripano.
4. Tomar 15 uL de la dilución anterior y proceder al conteo celular utilizando la cámara de Neubauer.
5. Realizando los cálculos necesarios del # de células contenidos en la suspensión celular, tomar los uL o mL que contienen la cantidad de células que se requieren para propagar en un tiempo determinado o montar experimento.
6. Sanitizar la(s) caja(s) antes de ser introducida(s) a la incubadora.
7. Distribuir el contenido de la(s) caja(s) con movimientos norte-sur y este-oeste.
8. Después de unas horas verificar al microscopio que las células estén adheridas.

### 15.3.6 SEGUIMIENTO DE CULTIVO CELULAR, VIABILIDAD Y CONTEO TOTAL CELULAR.

Una vez que se han estandarizado los cultivos y el numero total de celular requeridas se acerca al numero deseado, se realiza un nuevo procedimiento de despegamiento. Con los pasos vistos anteriormente (5.4.6) para determinar la cantidad total de células para iniciar la preparación y colocación en las jeringas que serán necesarias para la inoculación de las células en el peritoneo de los ratones nude.

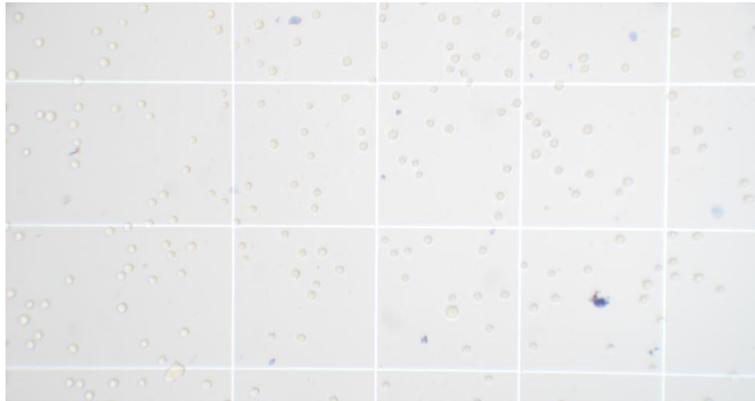


FIG. se muestra un conteo tradicional en camara de Neubauer con gran cantidad de células vivas y con un índice de mortalidad bajo del 2 % del total del cultivo.

### 15.3.7 PROTOCOLO DE COLOCACIÓN DE CÉLULAS SWIP-2 EN JERINGAS PARA INOCULACIÓN.

Se determino el numero total de células las cuales se alcanzaron en un trayecto de 2 semanas un numero de 210,000,000 colocadas en 3 cajas de t 250. Al determinar el numero total de células iniciamos el paso a la jeringas de insulina para su inoculo.

- a) Se determino el numero total de células en el cultivo realizado con células SWIP-2
- b) Se retira el medio de cultivo por decantación sin dificultad debido a que las células encuentran fijas en en la caja
- c) Se inicia un protocolo de despegamiento descrito anteriormente.
- d) Una vez despegadas las células se resuspenden y colocan en tubo conico de 15 ml, y se centrifuga a 1250 rpm.
- e) Obteniendo el pelep total celular, realiza una cuenta en la camara de

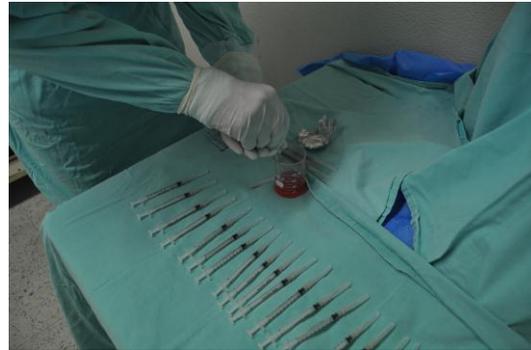
neubauer y se determina el numero total de células.

- f) Posteriormente se realiza una dilución y resuspendido entre el numero total de células deseadas por jeringa la cuales son de 2,500,000 mismas que se colocan en 1 ml de medio de cultivo carente de PBSA.
- g) Realizando una mezcla homogénea que a l momento de resuspender se encontrara un numero exacto del mismo para las 20 jeringas necesarias para la inoculación.

#### **15.4 INOCULACION INTRAPERITONEAL DE CELULAS SWIP-2 Y SEGUIMIENTO POSTINOCULACION.**

Una vez obtenida el numero total de células y siendo cuantificadas por millilitro de solución en cultivo para cada jeringa se inicia el método de inoculación celular el cual es indicado en los siguientes pasos.

- 1.- se realiza esterilizacion, acomodeacion y preparación del area en donde se realiza la inoculación mismo que se encuentra en el laboratorio de neurofisiología en el area de cultivos 4 mts de distencia del sitio en donde se cultivan las células.
- 2) se colocan las jeringas de insulina en orden para su control y registro asi como la solución que contine el total de las células necesaros los cuales son 50,000,000 correspondiendo 2,500,000 celulas por jeringa.



- 3.- Se toma el raton nude en las manos y se coloca de forma supina tomandolo del cuello y la cola, marcando una area de puncion en el cudrante inferior derecho, realizando un repliegue cutáneo para evitar perforación de vicera hueca e infiltrando lentamente el contenido de la jeringa en el interior de la cavidad peritoneal.

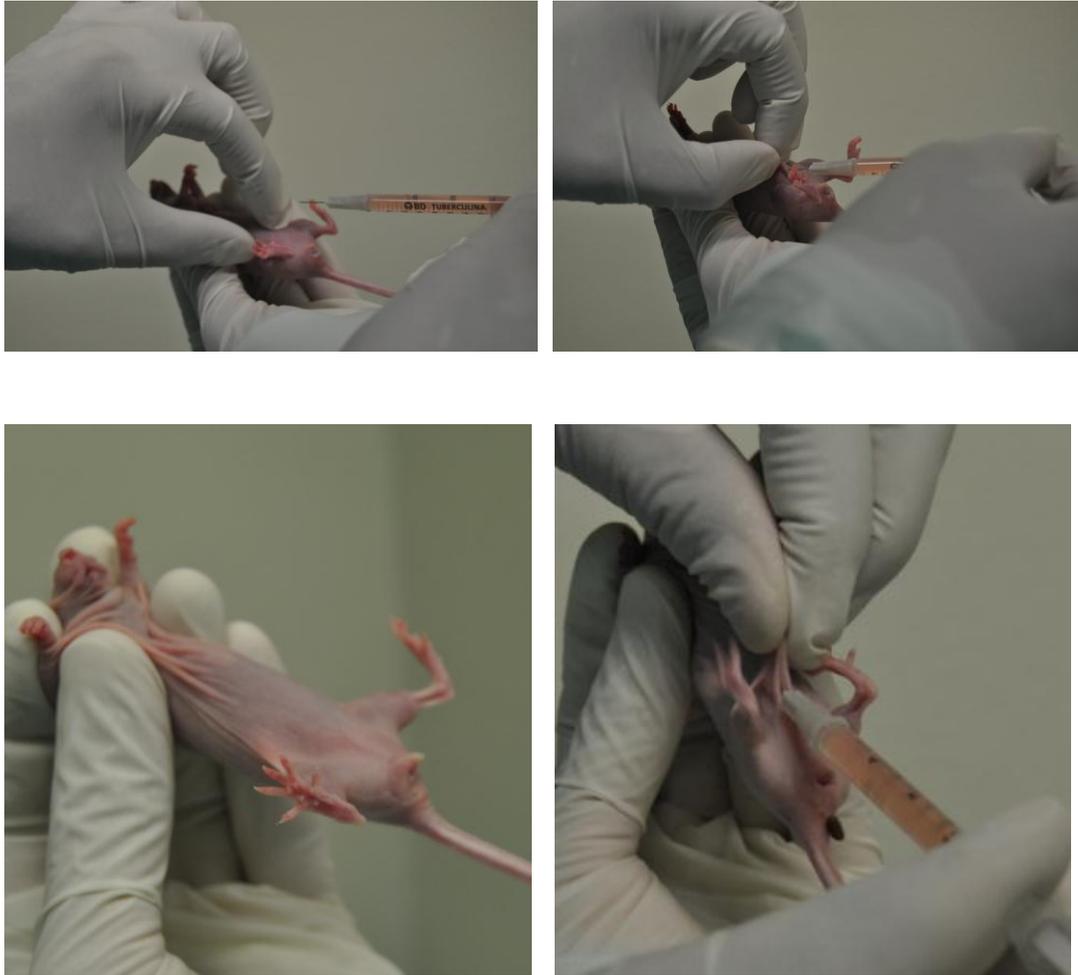


FIG. Ratones nude sanos. Se observa la técnica de inoculación intraperitoneal en el cuadrante inferior derecho.

### **15.5 MÉTODO DE SEGUIMIENTO EN BIOTERIO.**

Una vez realizado el método de inoculación de células SWIP-2 en una cantidad de 2,500,000 intraperitoneal se continua con la observación y valoración de los ratones nude en el bioterio.

Usando como parámetros de seguimiento y cuidado, la vitalidad, movilidad, ingesta de alimento y agua, así como la medición de perímetro abdominal diariamente datos de sepsis e irritación peritoneal en caso de una perforación inadvertida de víscera hueca en el procedimiento de inoculación.

El tiempo de seguimiento después del inóculo para la realización del procedimiento quirúrgico fue de 12 días.

## 15.6 GRUPOS DE ESTUDIO.

Este estudio se baso en la comparación de 4 grupos principales los cuales se define cada uno por separado nombrados.

- 1) Grupo Control.
- 2) Grupo de Hipertermia.
- 3) Grupo de Hipertermia con 5-FU.
- 4) Grupo de Normotermia con Bevacizumab.



FIG. Imagen una vez inoculado los ratones nude intraperitonealmente se dividen por grupos para su seguimiento y observación.

### 15.6.1 GRUPO CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL CONTROL.

Se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones nude inoculados intraperitonealmente 12 días previos con células SWIP-2, manejados con laparotomía exploradora, evacuación del líquido de ascitis, toma de biopsia y cierre de pared abdominal.

### **15.6.2 GRUPO CARCINOMATOSIS PERITONEAL TRATADA CON HIPERTERMIA.**

Se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones nude inoculados intraperitonealmente 12 dias previos con células SWIP-2, manejados con laparotomía exploradora, evacuación del liquido de ascitis, toma de biopsia, irrigación a flujo continuo de solución hipertérmica y cierre de pared abdominal.

### **15.6.3 GRUPO CARCINOMATOSIS PERITONEAL TRATADA CON HIPERTERMIA CON 5-FU.**

Se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones nude inoculados intraperitonealmente 12 dias previos con células SWIP-2, manejados con laparotomía exploradora, evacuación del liquido de ascitis, toma de biopsia, irrigación a flujo continuo de solución hipertérmica mas 5- flurouracilo y cierre de pared abdominal.

### **15.6.4 GRUPO CARCINOMATOSIS PERITONEAL TRATADA CON NORMOTERMIA CON BEVACIZUMAB.**

Se seleccionaron aleatoriamente 5 ratones nude inoculados intraperitonealmente 12 dias previos con células SWIP-2, manejados con laparotomía exploradora, evacuación del liquido de ascitis, toma de biopsia, irrigación a flujo continuo de solución normotérmica con bevacizumab y cierre de pared abdominal.

## **15.7 PROCEDIMIENTO QUIRUGICO.**

El procedimiento quirurgico es llevado acabo en el interior de bioterio para evitar los cambios de temperatura asi como la exposición de los ratones nude al medio ambiente, utilizando una mesa quirúrgica previamente sanitizada y recubierta por medio de campos esteriles en su totalidad para evitar contaminación

### **15.7.1 EQUIPO UTILIZADO.**

El equipo utilizado para el momento quirugico previamente esterilizado por 45 mintos a base hipoclorito al 2% por 15 minutos seguido de irrigación con alcalzide a diluciones estelizantes.

Listado de equipo utilizado para el procedimiento quirúrgico:

- 1.- equipo esteril de asepsia y antisepsia (isodine espuma, isopos, gasas, campos, sábanas, batasquirugicas, guantes, botas, cubrebocas, gorros).
- 2.- material quirúrgico (mesa quirugica, arco quirugico hojas de bisturí, pinzas apson, tijeras metzenbaun, porta agujas, retractores de pared).

3.- Equipo de irrigación y succión. ( bomba automática tipo ----- , equipo de venoclisis tipo -----, filtro de succión.

Sol salina al.9% con el medicamento utilizado.

4.- equipo para control de temperatura. ( Termo baño marca -----, termómetro de laboratorio de 100 grados, termómetro digital de 100 grados, termómetro convencional digital de 43 grados.



FIG. Instrumental quirurgico utilizado dentro del bioterio junto con las bombas de infusión.

### **15.7.2 PREPARACION DE MEDICAMENTOS Y DILUCION.**

#### **SOLUCION CON 5 FLUROURACILO**

Solución salina al 0.9% 160 mg de 5 FU en 200 ml. A una dosis de 40 mg por raton.

#### **SOLUCION CON BEVACIZUMAB**

Solución salina al 0.9% más 80 mg bevacizumab: correspondiendo a 20 mg por raton . En una solución salina al 0.9% se coloca la dosis con aguja del numero 14 extrayendo y pasando lentamente a la solución evitando la turbulencia y colocándola al medio a una temperatura de 27 grados.

#### **SOLUCION HIPERtermIA**

Solución salina al 0.9% 200ml. Se coloca en solución hipertérmica en el termobañó a 72 grados centígrados con perdida de 30 grados en el sistema de infusión llegando a la cavidad abdominal a una temperatura de 42 grados centígrados.

### 15.7.3 Regulación de temperatura para hipertermia

Se utilizo un termo baño previamente esterilizado, colocando 4 litros de solución inyectable esteril con calentamiento progresivo hasta llegar a 72 grados centígrados, una vez obtenida la temperatura se introduce la solución previamente preparada con el medicamento en el caso del 5-FU o bien únicamente la solución para el grupo de hipertermia. Una vez iniciado y determinado el flujo de irrigación en la cirugía, se pierden aproximadamente 30 grados C, en el trayecto de sistema de clisis desde su salida de la bolsa hasta la llegada al abdomen del raton nude, asi logrando una temperatura terapéutica de 42 grados C. FIG (continuos en el peritoneo.



FIG. Medicion contante de la temperatura mediante termómetro digital en el interior de la cavidad abdominal monitorizando una temperatura contante de 42 grados C.

### 15.7.4 Programacion de flujos de entrada y salida intra peritoneal con bombas de infusión.

El manejo el flujo de entrada para todos los grupos es igual, con excepción del grupo control. Se calculo un flujo de solución a 6 ml por kilogramo por hora. Con una duración de la irrigacion de 25 minutos, teniendo como resultado un volumen total de irrigación de 50 ml de la solución preparada.



FIG. a) bomba de infusión marcando el flujo continuo entrante en la cavidad abdominal. b) Sistema de flujo entrante y saliente en conjunto con la bomba de infusión y la maquina de termoregulacion de soluciones.

### 15.7.5 Zoletil como anestésico.

Anestésico.

Zoletil \*50 liofilizado con diluyente de 5ml, de uso veterinario como anestésico general inyectable, con fórmula vial de 5ml que contiene toletamina base (como clorhidrato) 125mg y zolazepam base (como clorhidrato) 125mg con diluyente c.b.p de 5ml, y que nu8na vez reconstruido contiene 50mg por ml.

El zoletil\*50 es una combinación de un agente disociativo, clorhidrato de toletamina y un tranquilizante del grupo de las benzodeazepinas, clorhidrato de zolazepam. Se puede utilizar como agente inductor, sedante y anestésico. Mejora el grado de tranquilidad e inconciencia y promueve una recuperación más suave. Zoletil\*50 es muy seguro de usar gracias a su amplio margen terapéutico y efectos secundarios limitados:

- No causa depresión respiratoria.
- No produce efecto epiléptico por su combinación.
- Disminuye la temperatura corporal transitoriamente.
- No hay toxicidad hepática o renal.
- Se mantienen reflejos laríngeos, podal y palpebral.
- Puede ser usado en animales gestantes.

En cuanto a su efectividad:

- Rápido inicio de acción: alrededor de un minuto vía IV y de 3 a 5 minutos por vía IM.
- Buen efecto anestésico.

- Relajación muscular instantánea.
- Inmediata analgesia superficial.
- Suave despertar entre 30 minutos y 2 horas.

A dosis bajas se utiliza como inductor de anestesia inhalada y como sedante para facilitar el manejo de pacientes agresivos y nerviosos, así como manipulaciones dolorosas como tomas radiológicas o curación de heridas. Su vía de administración es IV o IM. La duración de la anestesia depende de la dosis empleada, se advierte que una vez reconstituido el liofilizado se puede conservar en refrigeración 8 días, la actividad se mantiene mayor a 90% durante este tiempo.

#### **15.7.5.1 Técnica anestésica.**

Una una vez que se tenga todo el equipo quirúrgico listo se realiza el método anestésico, mediante dosis IM de Zoletil, con fijación de extremidad y cuerpo del raton nude, se determina punto de puncion a nivel de muslo izquierdo e infiltración rápida. Posteriormente se espera el efecto anestésico deseado hasta que los movimientos voluntarios del raton nude sean abolidos, permitiendo el mantenimiento de movimientos respiratorios. Permitiendo la fijación del raton a la mesa quirurgica y listo para iniciar procedimiento.



#### **15.7.5.2 Farmacocinetica en el raton desnudo.**

Colocado el anestésico IM en el muslo izquierdo del raton desnudo, el inicio de efecto comienza a los 15 segundos presentando movimientos atáxicos y discordinacion motriz, teniendo su efecto anestésico a los 2 minutos de la aplicación, tiene su efecto máximo a los 20 minutos y una latencia de 30 minutos.

#### **15.8 Técnica quirúrgica.**

La técnica quirúrgica se describe con los siguientes pasos:

## POSTGRADO DE CIRUGIA ONCOLOGICA ADULTOS

1.- pesar al ratón desnudo.



2.- Fijación a la mesa quirúrgica por las cuatro extremidades.

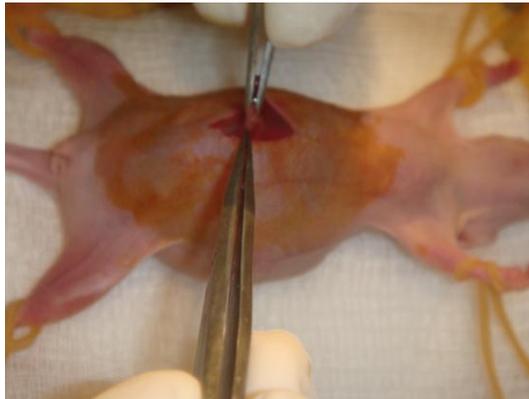


3.- Se realiza antisepsia con isodine espuma e isopo estéril.



4.- se coloca oxígeno a nivel facial a un flujo de 3 litros por minuto.

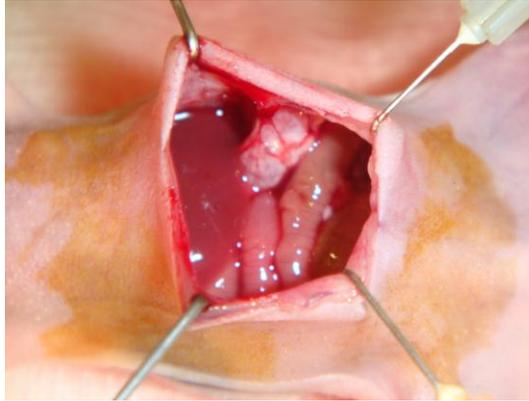
5.- incisión media por planos iniciando por piel, incidiendo por planos hasta llegar a aponeurosis anterior, la cual se incide hasta llegar a cavidad abdominal.



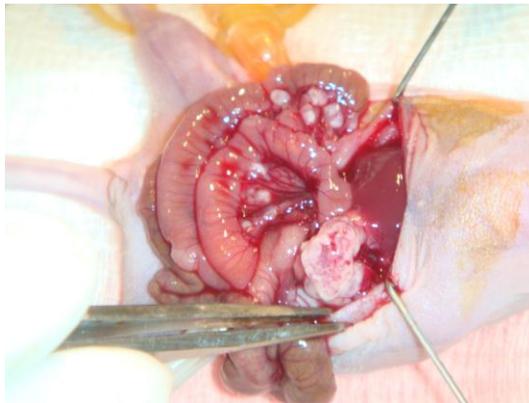
6.- Se toma muestra y cuantifica liquido de ascitis.



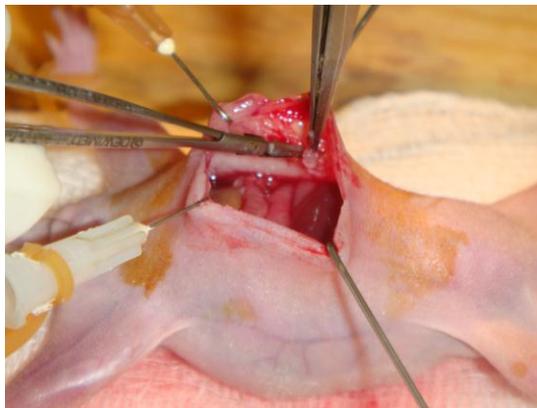
7.- colocamos 4 retractores abdominales , uno en cada cuadrante de la pared abdominal, con elevación del arco para provocar en la cavidad abdominal un reservorio.



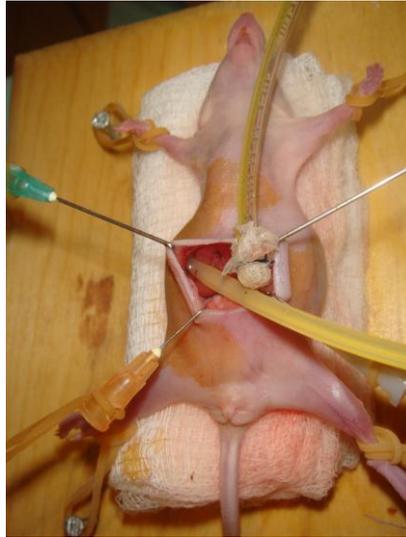
8.- realizamos laparotomía exploradora identificando las zonas peritoneales que se encuentran con carcinomatosis macroscópica. Asi como con carcinomatosis en órganos.



9.- Se toma muestra de biopsia correspondientes al segmento 8 del peritoneo.

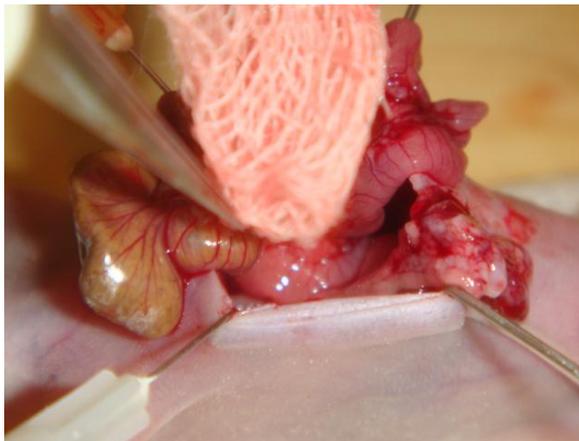


10.-Una vez determinada la cavidad abdominal se coloca los tubos de clisis, colocandolas para la irrigación a nivel de hipocondrio derecho y para la succión en hueco pélvico.



11.- Se inicia el manejo con irritación- succion hasta el termino del tiempo predeterminado asi como su flujo.

12.- una vez terminado el tiempo de irritación, retiramos los tubos de clisis y realizamos secado de la cavidad abdominal con una gasa seca.



13.- Realizamos cierre en 1 planos; para la aponeurosis y piel con vycryl 5 ceros y refuerzo cutáneo con cianocrilato.



14. Colocamos a los ratones nude postquirurgicos en area de recuperación con aporte de O2 a 5 litros por minuto y temperatura de 37 grados centígrados.



### **15.9. SEGUIMIENTO POSTQUIRUGICO:**

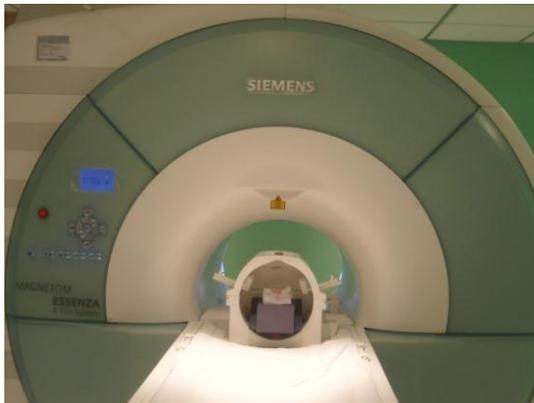
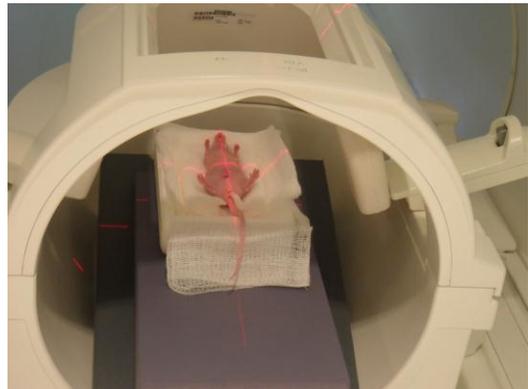
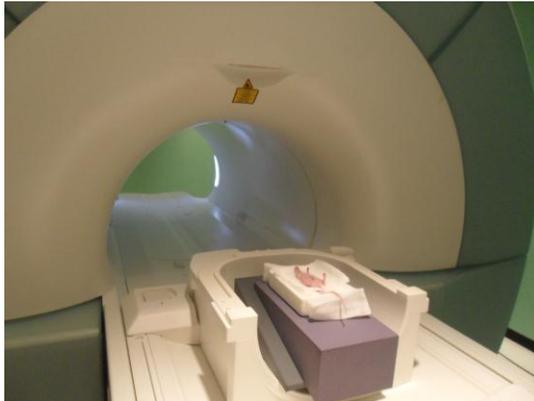
Una vez que la totalidad de los ratones nude fueron operados, se colocaron por grupos en el lugar establecido previamente para mantener las condiciones necesarias para evitar infecciones oportunistas y observar las complicaciones postquirurgicas inmediatas, mediatas y tardias.

El seguimiento clinico consistió en la observación de morbilidad en bases a la ingesta de alimentos, movilidad, reactividad, nueva formación de ascitis. Y los días posteriores a la cirugía cuando se presenta la muerte.

## 15.10 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR EN LA CARCINOMATOSIS.

Se realizaron 3 estudios únicos de RMN. Con el fin únicamente demostrativo de la presencia de carcinomatosis, como la implicación posterior al tratamiento; sobre todo haciendo una comparación de ratón nude control con carcinomatosis y ratón nude con carcinomatosis tratado con bevacizumab.

- 1.- El primer estudio por RMN se tomó a un ratón nude sano sin carcinomatosis peritoneal.
- 2.- El segundo estudio por RMN se realizó a un ratón nude con implantación de células SWIP-2 con desarrollo de ascitis correspondiendo al grupo control a 7 días posteriores al manejo quirúrgico.
- 3.- El tercer estudio por RMN se realizó con un ratón nude con implantación de células SWIP-2 con desarrollo de ascitis correspondiendo al grupo de bevacizumab 7 días posterior a tratamiento.



### **15.11 EL ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUIMICO CUANTIFICACION EN EXPRESION DE LOS RECEPTORES DEL VEGF.**

- 1) En todos los grupos independientemente del tratamiento al momento de realización de la laparotomía inicial se realizo toma de biopsia de cavidad abdominal correspondiente a segmento 7 u 8 del peritoneo.
- 2) Una vez que se determina la muerte del ratón nude, se realiza una autopsia la corresponde a la extracción y el estudio cavidad peritoneal tanto como órganos intraabdominales (estomago, intestino delgado y grueso, mesenterio, retro peritoneo, riñones, uréteres, cúpulas diafragmáticas, peritoneo. Así como también órganos torácicos como pulmones, corazón, grandes vasos, pleura, esófago.
- 3) De las piezas incluidas para histología mediante la tinción de HYE se determina la infiltración a los diferentes órganos abdominales por grupo.
- 4) Una vez determinado el grado de infiltración se determina el grado de necrosis del tumor correspondiendo a una + necrosis leve; necrosis moderada ++; necrosis intensa +++. Tratando de demostrar con ello la disminución del aporte sanguíneo distal al tumor en los diferentes esquemas de tratamiento y con ello el grado de necrosis por grupo.
- 5) Mediante inmunohistoquímica se determina la sobreexpresión del receptor al VEGF en el tumor y en los tejidos infiltrados, correspondiente a + expresión leve; ++ expresión moderada; ++ expresión intensa.

### **15.11 ANALISIS ESTADISTICO**

Se realizó una base de datos en el programa estadístico SPSS versión 18.0 y se efectuó un análisis descriptivo de cada una de las variables estudiadas.

Para las variables cuantitativas se emplearon medidas de tendencia central y dispersión de acuerdo a la distribución de datos.

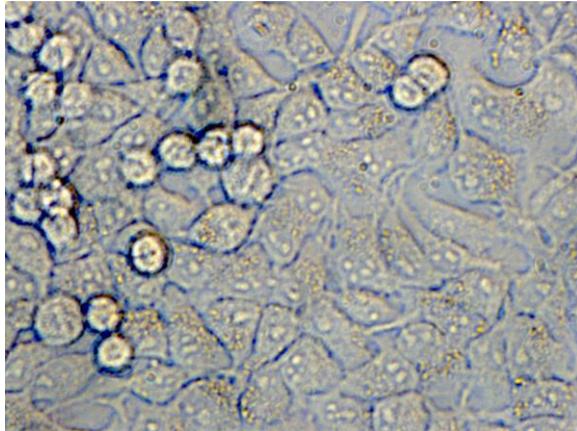
Para las variables cualitativas se emplearon frecuencias y porcentajes.

La comparación entre grupos fue realizada por medio de la prueba de Chi-cuadrada, t de student y prueba de Kruskal-Wallis

Se considero significancia en una P de 0.05.

## 16. RESULTADOS

RESULTADOS EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO PARA LA OBTENCION DEL TOTAL DE CELULAS SWIP-2 PARA SU IMPLANTACION.



El inicio de la cuantificación de células posterior a la descongelamiento del vial fue de 80,000 obteniendo un índice de de replicación de 1 mitosis por cada 12 hrs.

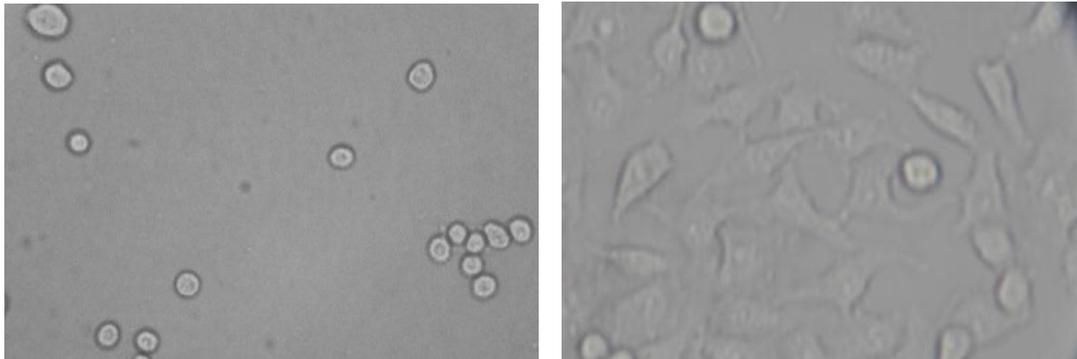


FIG. a) número de células obtenidas del vial al descongelar correspondiendo a un total de 80,000. Obsérvese su forma redondeada original. 40x b) Células SWIP-2 posterior a 24 hrs después obsérvese las prolongaciones adherentes confinándoles una fona estelar. 40x.

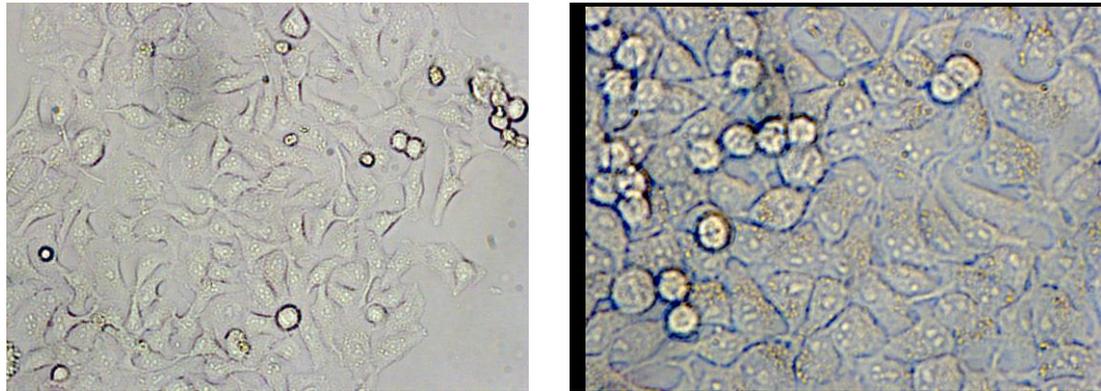


Fig. a) número de células a las 36 hrs de iniciado el cultivo 40x. b) número de células a las 48 hrs de iniciado el cultivo 40x.

Una vez establecido el cultivo y posterior a la cuantificación celular deseada se relazan mediante la tripsinización la colocación de las células como 2 en las jeringas de inoculación obteniendo el número deseado de 40 millones de células en 9 días de cultivo.

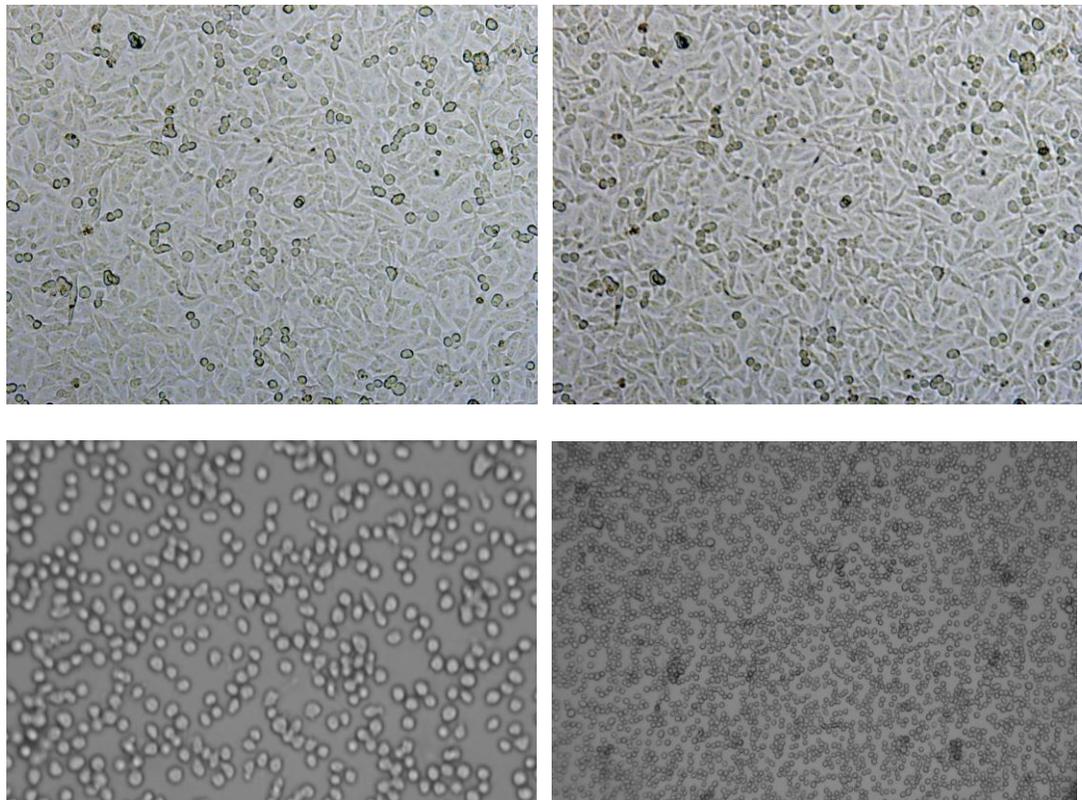
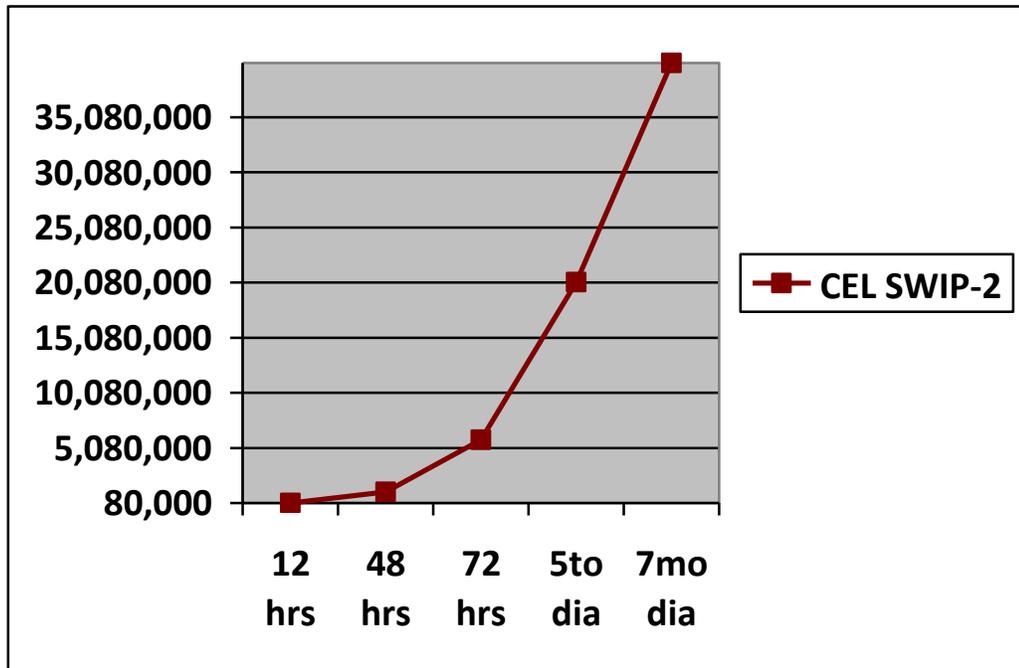


Fig. a) Células SWIP-2 con confluencia del 80% del total de la caja cultivo, presentando prolongaciones por adherencia a la caja de cultivo 10x b) Células SWIP2 2 a las 48 hrs del cambio de caja de cultivo con una confluencia del 100%

observándose células por encima de la monocapa de células en un segundo plano con formación de una bicapa de células. 10x c) células SWIP-2 una posterior a la colocación de tripsina, denotando la forma original redondeada de las células al ser liberadas de sus prolongaciones adherentes 40x. d) misma foto en un objetivo 10 x observándose la gran cantidad de células ya libres y en flotación.

GRAFICO DEL INDICE MITOTICO DE LAS CELULAS SWIP-2 CULTIVADAS.



Grafica. En esta grafica se establece el índice de mitosis celular de este cultivo con células SWIP-2 presentando una mitosis cada 24 hrs. Observamos que a las 12 hrs aun contamos con el número inicial de células que fue de 80,000, posterior la revisión secuenciada y cuantía se cuantifican a las 48 hrs 1, 100,045 células obteniendo el numero deseado de células a al 7mo día con aproximadamente 40, 000,000 de células.

## RESULTADOS DE LA IMPLANTACION

Una vez obtenida el número total de células para su la implantación correspondiendo a 2, 500,000 de células por jeringa para cada ratón, se inoculo a nivel peritoneal. Esperando 12 días posteriores a la inoculación para someterse a cirugía y observándose si la implantación de las células SWIP-2 fue exitosa.

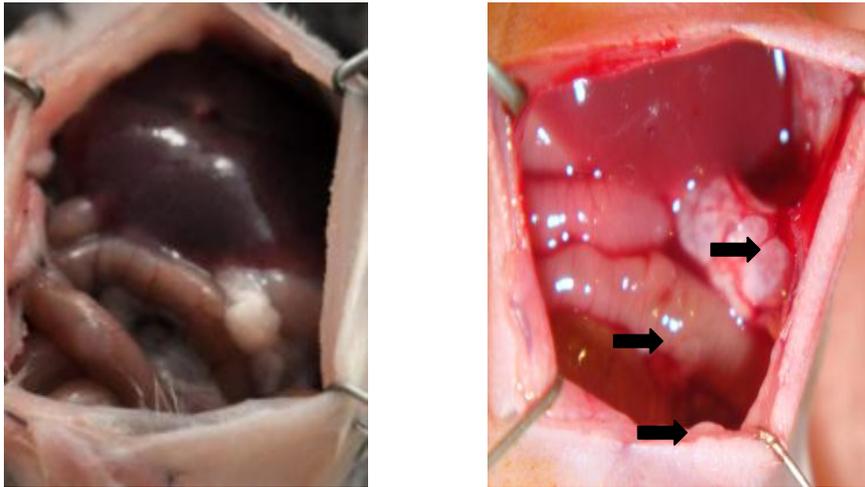
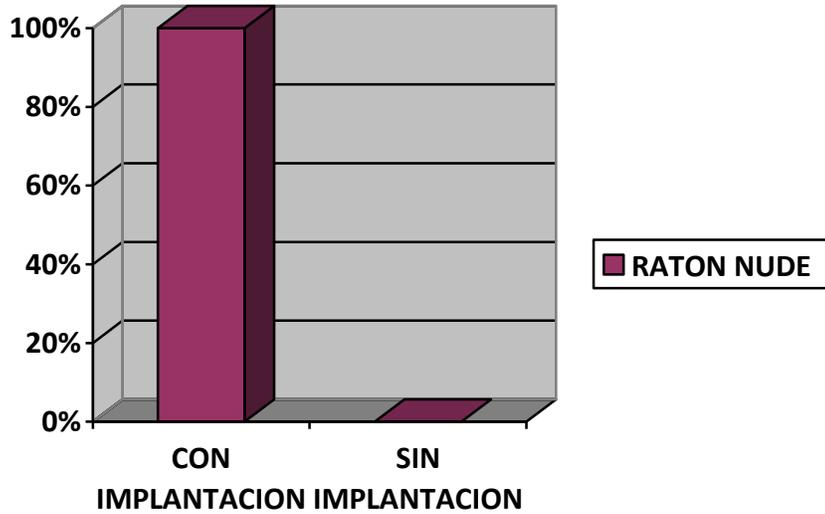


FIG. a) Ratón nude sano sin implantación de células SWIP-2 en laparotomía exploradora. b) ratón nude con implantación exitosa de células SWIP-2 con carcinomatosis peritoneal. Las flechas demuestran los implantes gástricos, peritoneales e intestinales.

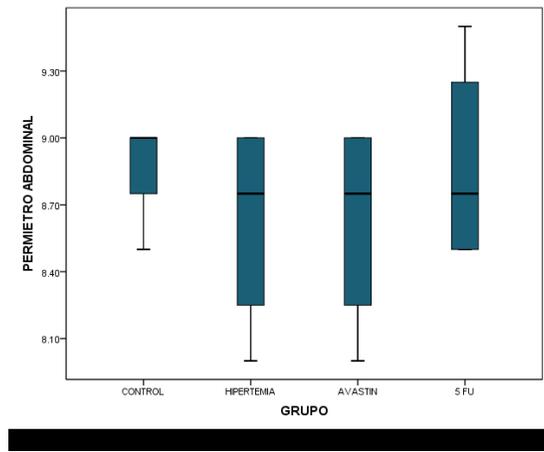
En la implantación de los 16 ratones implantados con células SWIP-2 el 100% fue exitosa lográndose un índice de carcinomatosis satisfactorio y logrando que los grupos fueran homogéneos.

**GRAFICO DE IMPLANTACION PERITONEAL DE LAS CELULAS SWIP-2**



Una vez inoculadas las células intraperitonealmente y posterior a 12 días de implantación peritoneal de las mismas para la formación de carcinomatosis peritoneal se realiza el tratamiento quirúrgico por grupos de los que se desglosa. Al ingresar los datos para detectar la homogeneidad de los grupos se realizó el análisis de las mediciones de perímetro abdominal, líquido de ascitis medido así como el índice de carcinomatosis peritoneal en los cuatro grupos los cuales nos reflejo una P de 0.01

**GRAFICA DE MEDICION DEL PERIMETRO ABDOMINAL PREQUIRUGICO**



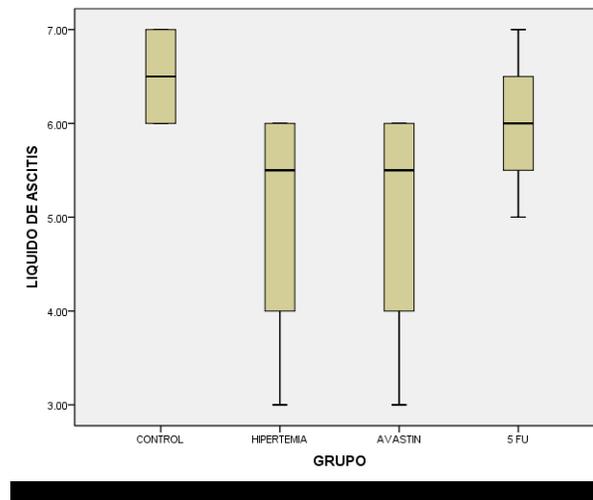
Se observa en la medición del perímetro abdominal un patrón homogéneo en los cuatro grupos aumentando ligeramente para el grupo control con 9 cm así con una homogeneidad absoluta en los grupos bevacizumab, hipertermia y 5 fluorouracilo de

8.8 cm no presentando aumento significativo. Con una mediana de 9 cm. Con una P de 0.16.



FIG. Ratones nude con aumento del perímetro abdominal por líquido de ascitis.

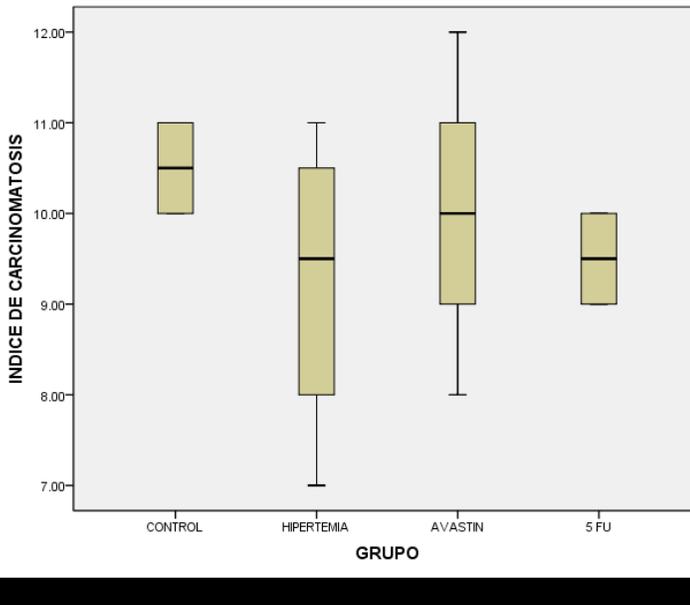
GRAFICO CUANTIFICACION DEL LIQUIDO DE ASCITIS EN RATON NUDE CON CARCINOMATOSISI PERITONEAL



En la cuantificación del liquido de ascitis encontramos un ligero aumento en la cantidad de liquido encontrado en el grupo control con una mediana de 6.5 ml por encima del grupo de 5 fluorouracilo con 6 ml y en relación a los grupos de

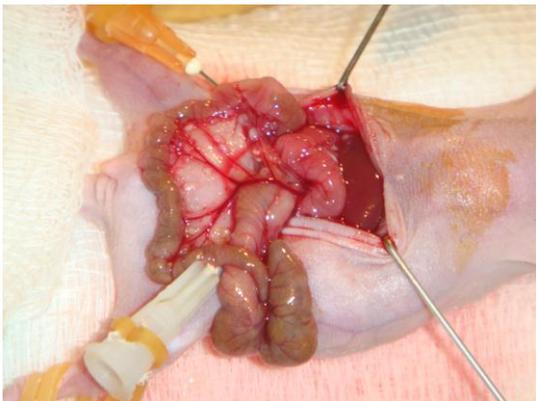
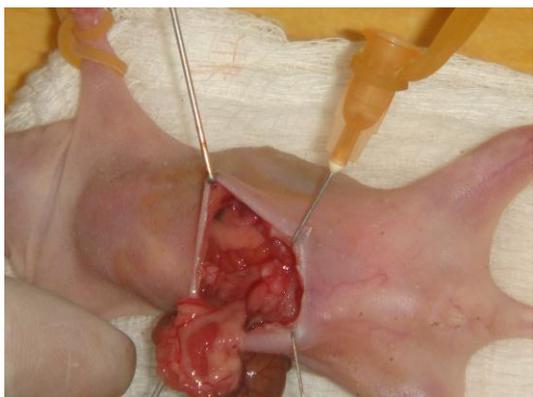
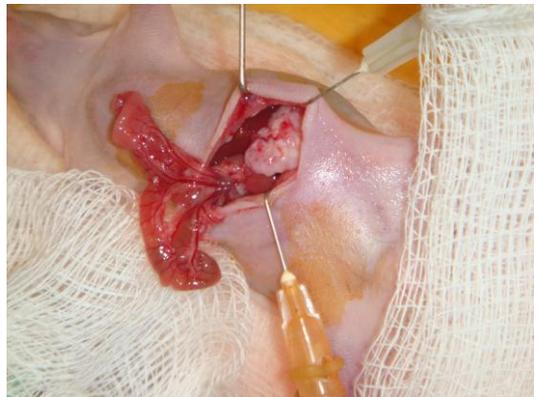
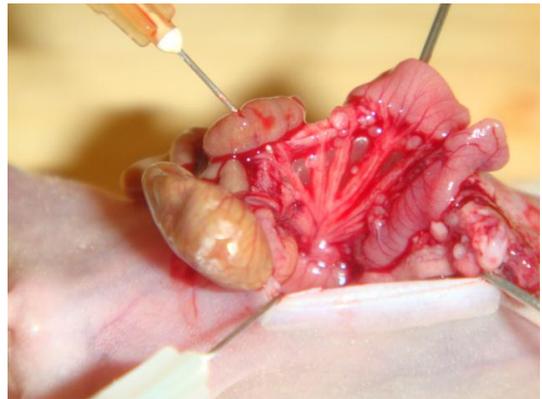
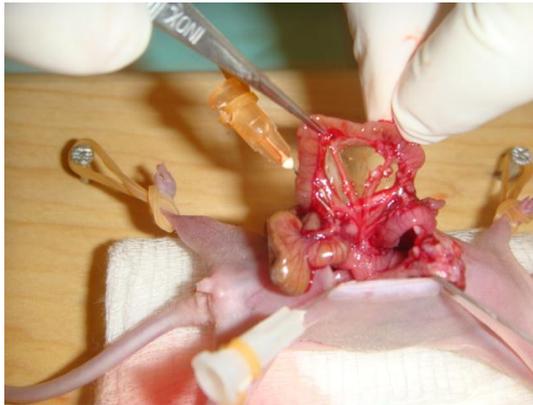
bevacizumab y el grupo de hipertermia con una mediana de 5.8 ml. No siendo una diferencia significativa con una mediana total de 6ml. Con una P de 0.26

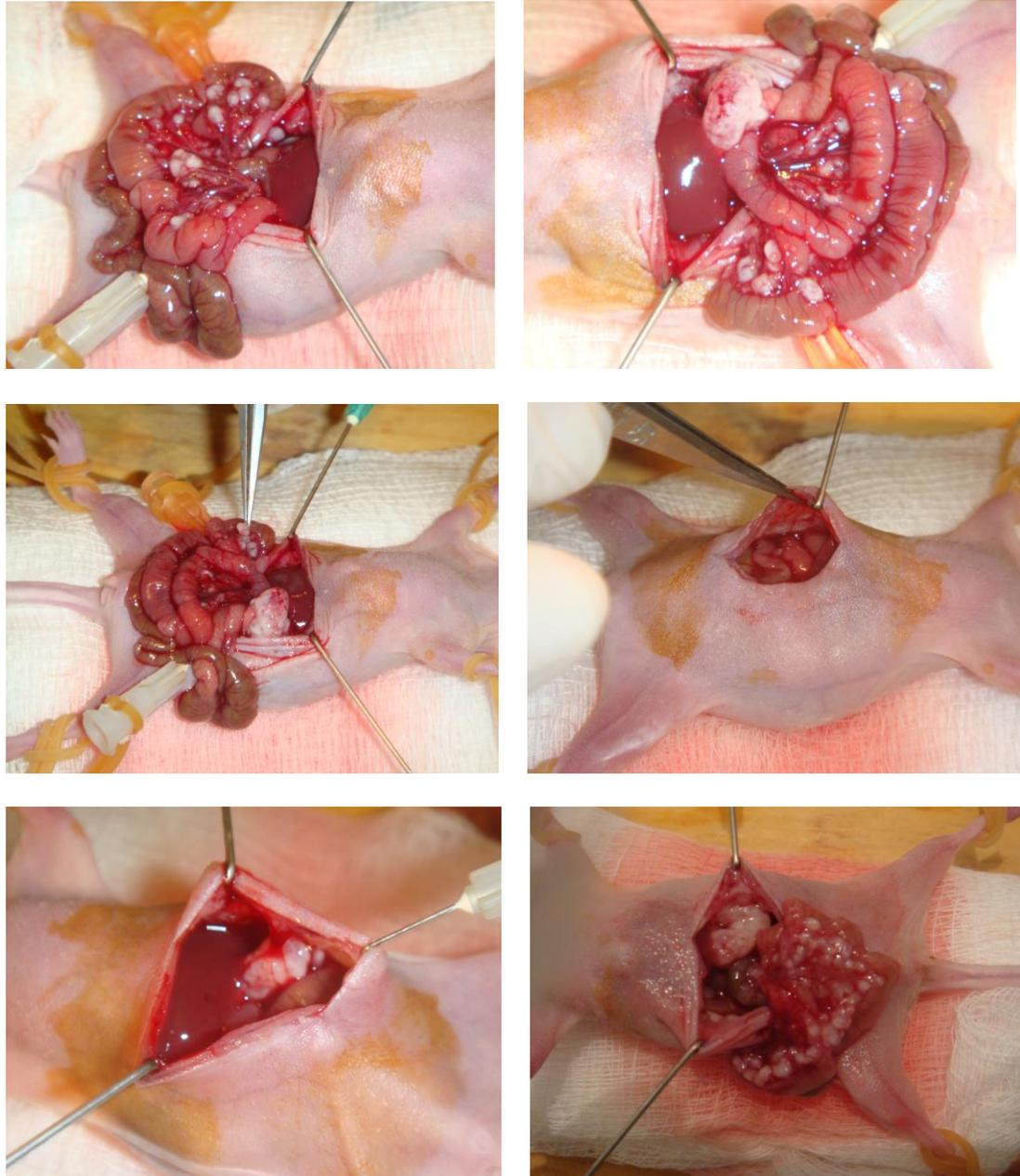
GRAFICA. INDICE DE CARCINOMATOSIS PERITONEAL EN RATONES NUDE IMPLANTADOS CON CELULAS SWIP-2



Se analizo el índice de carcinomatosis peritoneal en lo ratones nude inoculados con células SWIP-2 presentando una distribución homogénea en relación con los distintos grupos presentando un ligero aumento en los grupos control y bevacizumab con una mediana del índice de carcinomatosis peritoneal de 10.5 y de 10 respectivamente, seguidos de los grupos hipertermia y 5 fluorouracilo los cuales se igualan con una cuantificación de índice de carcinomatosis peritoneal de 9.5. presentando una mediana total por grupos de 10 puntos de índice de carcinomatosis peritoneal, con una P de 0.15.

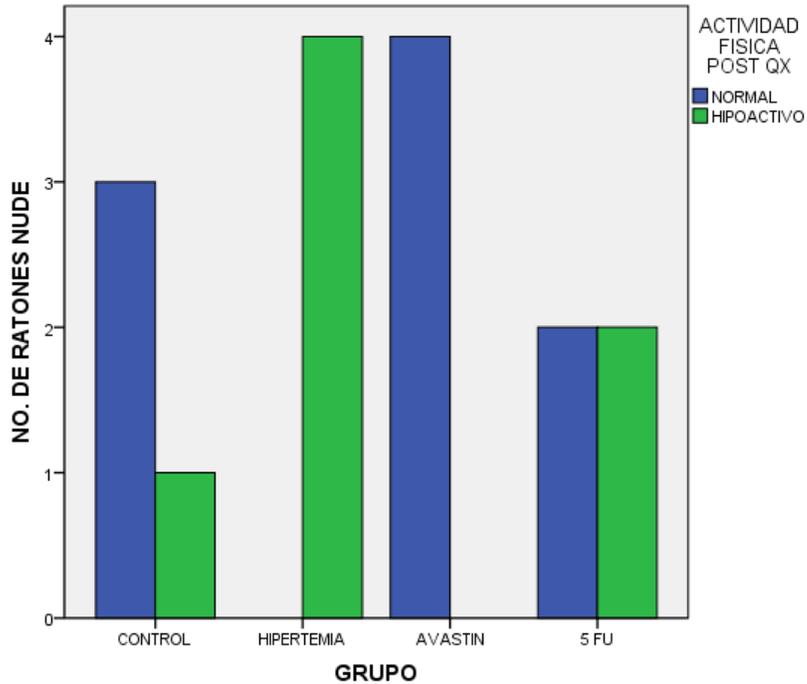
Durante el procedimiento quirúrgico y la realización de la laparotomía exploradora, se pudo determinar la afección a los distintos órganos intraabdominales por visión macroscópica resaltando que el 100% de todos los grupos tuvo afección macroscópica a peritoneo, estómago, intestino y fueron negativas en el 100 % de la exploración a hígado; indeterminadas para riñón, páncreas como se muestra en las siguientes imágenes.





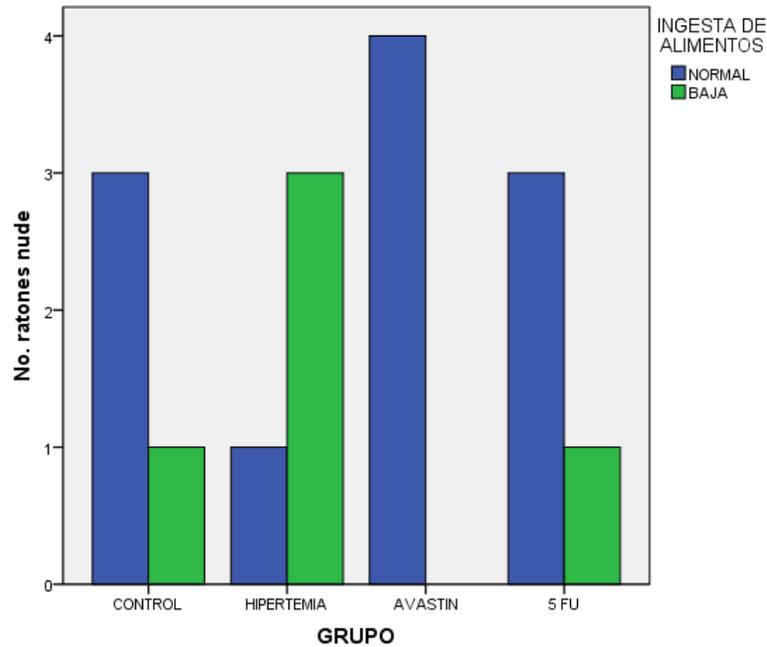
Una vez que se realizo el manejo quirúrgico por grupos, se hace el seguimiento clínico de los ratones nude en los diferentes grupos con los parámetros clínicos la reactividad catalogándolo en la perdida de la relación vigilia- sueño como normal e hipo activo. La ingesta de alimento y agua en el postoperatorio mediato separando cada ratón con una unidad alimenticia y cantidad de agua igual en todos los ratones catalogándolos con ingesta adecuada y baja.

GRAFICA. ACTIVIDAD FISICA POSTQUIRUGICA EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL.



Se determina la actividad física en activo e hipo activo siendo para el grupo control únicamente uno de los ratones la presenta, para el resto de los ratones del grupo control tuvieron una actividad adecuada; para el grupo de hipertermia cuatro ratones del grupo se presentaron hipo activos no siendo así para el grupo de bevacizumab presentando buena actividad física en los cuatro ratones del grupo, para el grupo 5 flurouracilo 2 ratones presentaron adecuada actividad y dos ratones se presentaron hipo activos teniendo una P de 0.031.

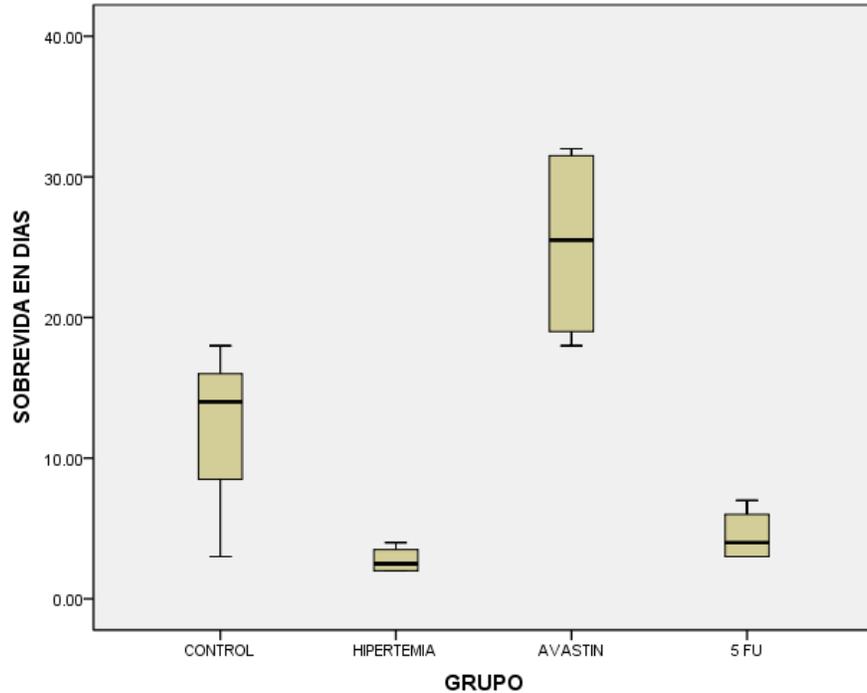
GRAFICA. INGESTA DE ALIMENTO POSTQUIRUGICO EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSISI PERITONEAL



La ingesta de alimentos en el postquirúrgico para el grupo control, en uno de los ratones disminuyo, no siendo así con los otros tres del grupo manteniendo una adecuada ingesta de alimentos, para el grupo hipertermia la mayor parte del grupo en numero de 3 disminuyo la ingesta de alimentos y solo en uno se mantuvo adecuada, en el grupo de bevacizumab los cuatro ratones mantuvieron una adecuada ingesta de alimentos y en el grupo de 5 flurouracilo disminuyo en uno de los ratones y se mantuvo adecuadamente en 3 ratones teniendo una P de 0.13.

Se realiza el seguimiento de a sobrevida apartar del manejo quirúrgico con los diferentes grupos que va desde el día 12 de la inoculación en relación por grupo teniendo los siguientes resultados.

GRAFICO. SOBREVIDA EN DIAS EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL POSTERIOR A TRATAMIENTO



La sobrevida en días posterior a tratamiento quirúrgico para el grupo control tenemos una mortalidad que inicia desde el 5to día la presentando una mediana de sobrevida de 15 días y un pico máximo de sobrevida de 18 días; para el grupo de hipertermia se presentó una distribución homogénea en el grupo presentando mortalidades a corto plazo iniciando desde el segundo día, con una mediana de sobrevida posterior al manejo quirúrgico de 4 días. Para el grupo de bevacizumab la sobrevida se prolongó notoriamente con inicio de mortalidad a los 19 días, presentando una mediana de sobrevida a los 26 días y un pico de muerte máximo a los 32 días; siendo el grupo con mayor sobrevida. El grupo de 5- fluorouracilo tenemos una mediana de sobrevida de 5 días y un pico máximo de mortalidad en días de 7. Presentando estos datos una P de 0.031

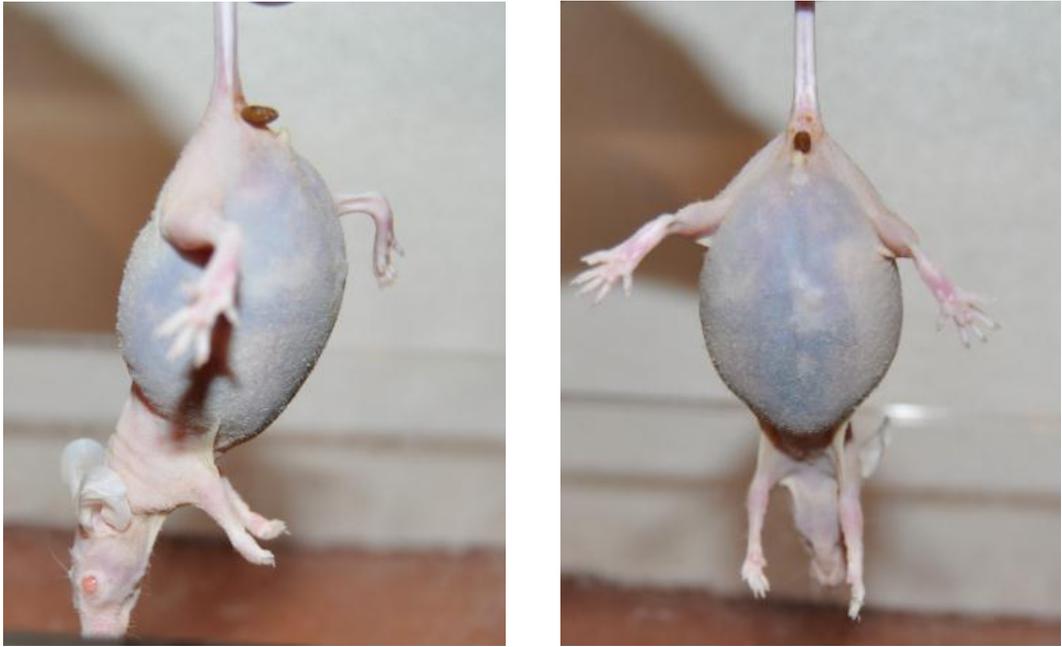
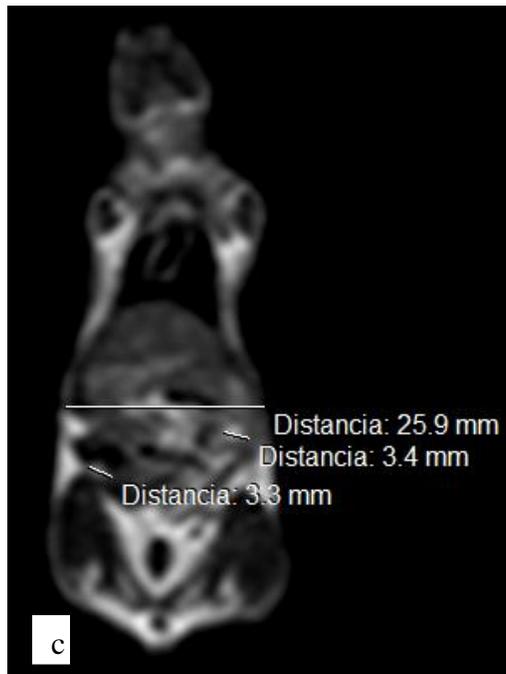
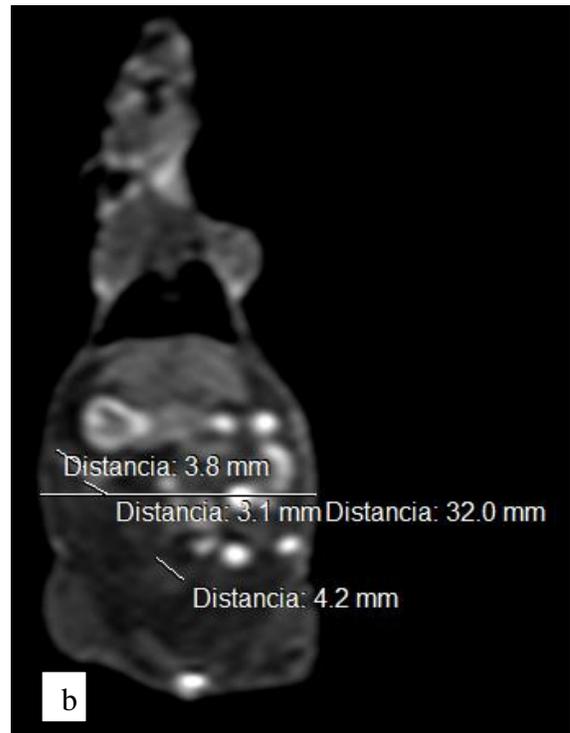
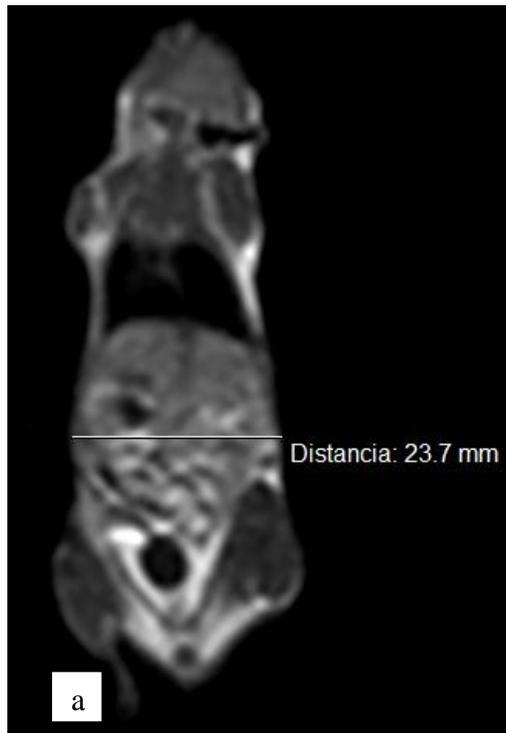


FIG. Ratón nude con carcinomatosis peritoneal a 9 días postquirúrgico correspondiendo al grupo control, obsérvese la nueva formación de ascitis a tensión y el adelgazamiento del tronco.

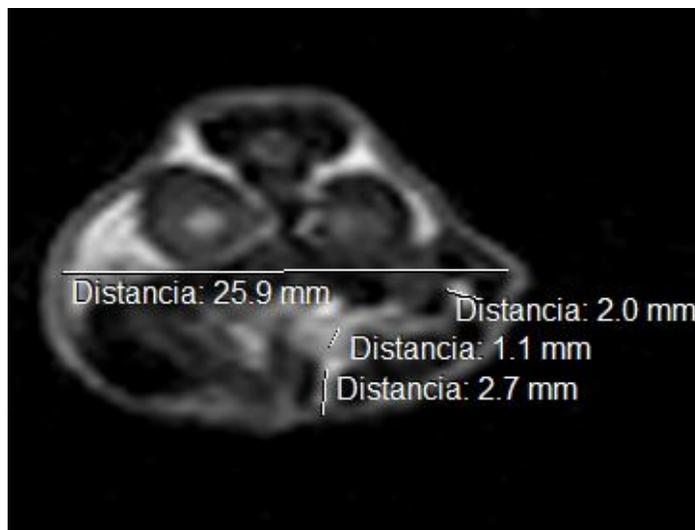
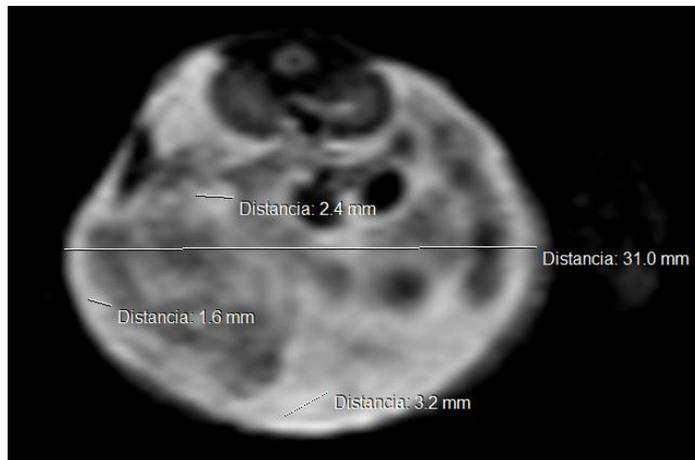
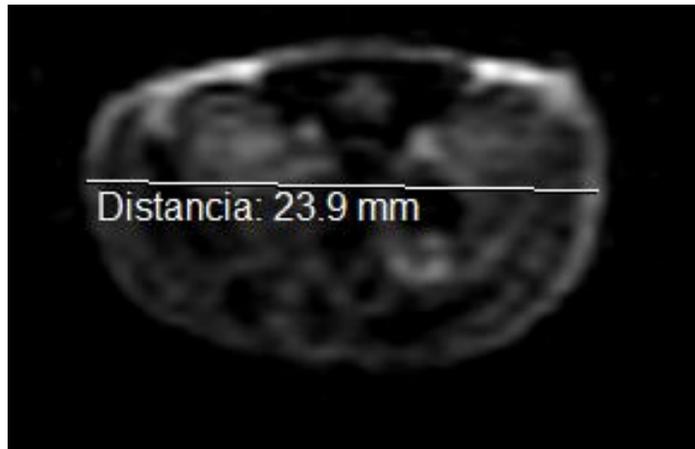


FIG. Ratón nude con carcinomatosis peritoneal a 9 días postquirúrgico correspondiente al grupo de Bevacizumab, nótese la disminución del perímetro abdominal así como los datos de tensión de la pared abdominal.

RESULTADOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR



a)RMN corte coronal de raton nude sano, sin implantación de celulas Caco2 sin lesiones aparentes. B) RMN corte coronal de raton nude del grupo control a 21 dias de implantación con celulas Caco2 intraperitoneal y a 7 dias postquirúrgico. Muestra lesiones hiperintensas que tienden a confluir las cuales solas miden de 3.1 mm hasta 7mm en confluencia con zonas hipointensas correspondientes a liquido de ascitis con aumento de 32mm de diámetro abdominal. c) RMN corte coronal de raton nude del grupo bevacizumab a 21 dias de implantación celular y a 7 dias postquirugico. Muestra lesiones hiperintensas aisladas de 3.3 y 3.4 mm no confluentes, con escasas zonas hipointesas correspondientes a ascitis con un diámetro abdominal de 25.9 mm



Se muestra los resultados de la RMN en un corte axial a) ratone nude sano sin implantación por células tumorales b) Ratón nude con implantación células tumorales correspondiendo al grupo control, se observan zonas de hiperintensidad redondeadas con borde mal definidos confluentes que miden 2mm a 3.2 mm con abundante zonas

hipointensas correspondiendo a liquido de ascitis, compresión de ambos riñones hacia la línea media y engrosamiento de pared abdominal, con diámetro abdominal aumentado de 31 mm. C) ratón nude con implantación de células Caco2, se observan zonas de hiperintensidad de 2.7 mm así como zonas de hipointensidad escaso liquido de ascitis, situación de riñones se encuentra respetada con un diámetro de cavidad abdominal ligeramente aumentada en relación con el ratón sano.



FIG. A la izquierda Ratones nude con carcinomatosis peritoneal a 10 días postquirúrgicos correspondientes al grupo control. A la derecha Ratones nude con carcinomatosis peritoneal a 10 días postquirúrgicos correspondientes al grupo bevacizumab.

RESULTADOS HISTOLOGIA

Todos las biopsia realizadas al inicio de la cirugía en los diferentes grupos fueron positivas con infiltración del peritoneo por células tumorales de cáncer de colon por células Caco-2 mostrando las siguientes imágenes a continuación donde se observan peritoneo en contacto con implante tumoral con y sin infiltración.

Se determino la infiltración tumoral por órganos en los diferentes grupos posterior al tratamiento y subsecuente a la muerte natural de los ratones nude con carcinomatosis peritoneal presentando los siguientes resultados.

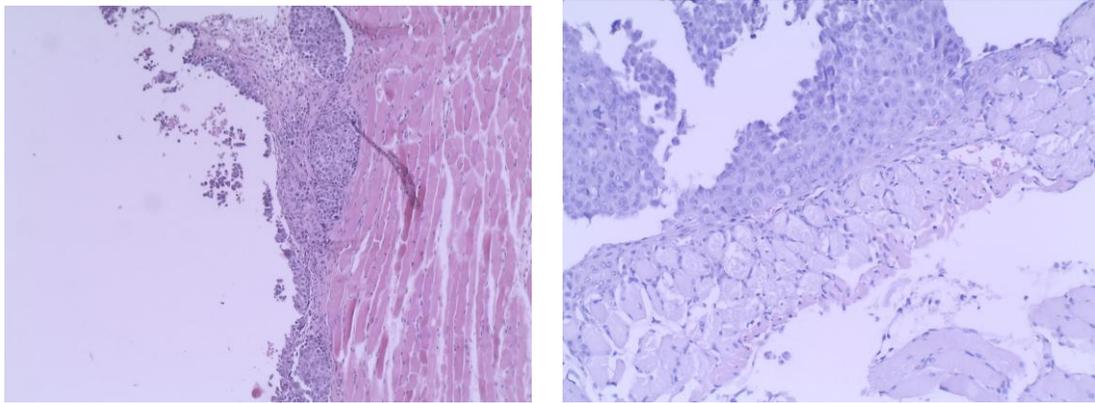
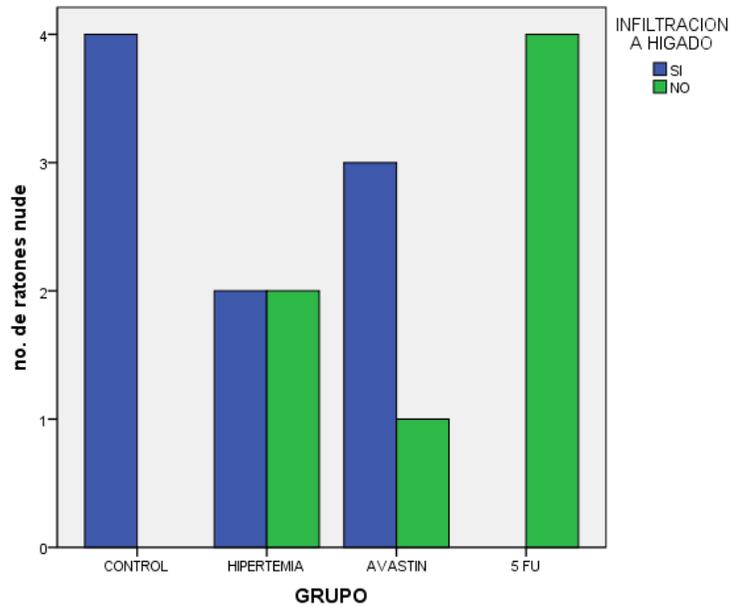


FIG. a) se muestra imagen histología donde se encuentra peritoneo parietal con implante de células tumorales sin presencia de infiltración peritoneal. b) Peritoneo parietal con gran implante tumoral infiltrando peritoneo. Tinción HyE.

Los resultados fueron basados en la infiltración de los órganos abdominales en los distintos tratamientos. El 100% de los ratones tuvieron infiltración e implantes a peritoneo.

GRAFICA. INFILTRACION HISTOLOGIA DEL TUMOR A HIGADO EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS



Se determino si infiltra o no infiltra a hígado posterior al tratamiento 4 de los ratones controles infiltra a hígado, del grupo hipertermia la mitad del grupo, dos infiltra y el resto de los dos ratones el tumor no infiltra a hígado. En el grupo de bevacizumab 3 de los ratones presentaron infiltración hepática, solo uno no presenta infiltración hepática, en el grupo de 5 fluorouracilo los cuatro ratones nude no presentaron infiltración hepática. Con una P de 0.031

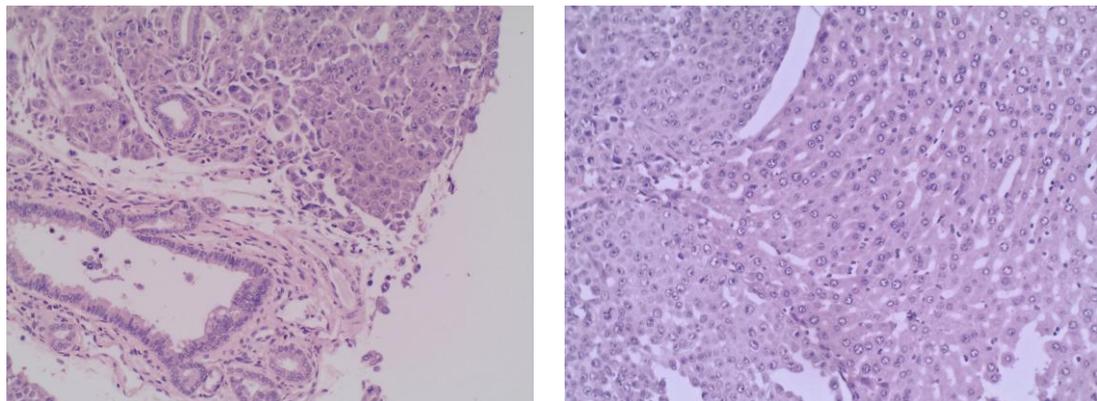
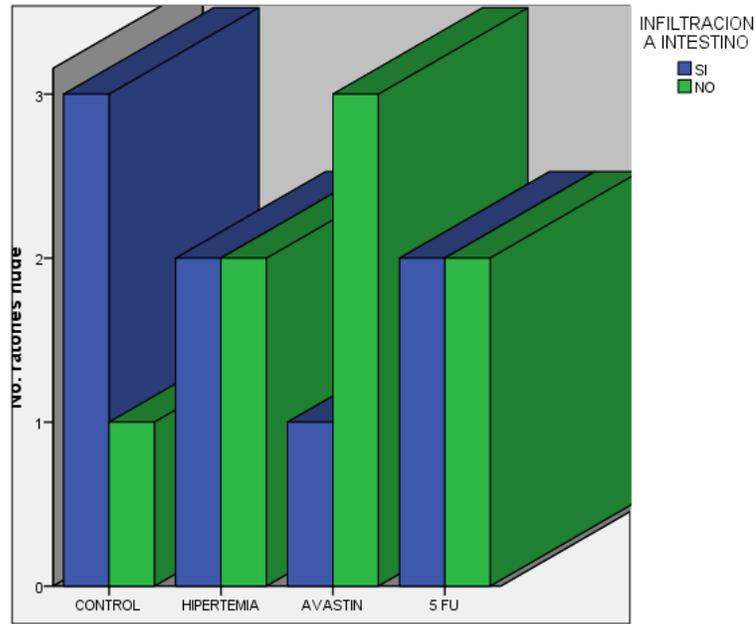


FIG. a) Infiltración tumoral en hígado.

GRAFICA. INFILTRACION HISTOLOGIA DEL TUMOR A INTESTINO EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS



Se determino si infiltra o no infiltra a pared intestinal posterior al tratamiento 3 de los ratones controles infiltra pared intestinal un solo ratón no tubo infiltración a pared intestinal, del grupo hipertermia la mitad del grupo, dos infiltra y el resto de los dos ratones el tumor no infiltra a pared intestinal. En el grupo de bevacizumab 1 de los ratones presentaron infiltración a pared intestinal, tres de los ratones del grupo bevacizumab no presenta infiltración a pared intestinal, en el grupo de 5 flurouracilo los dos ratones nude presento infiltración intestinal y dos no la presento con una P de 0.57.

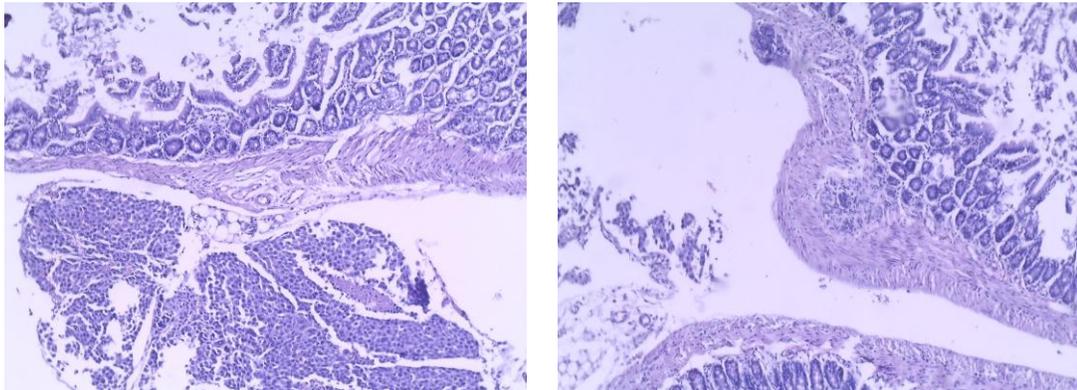
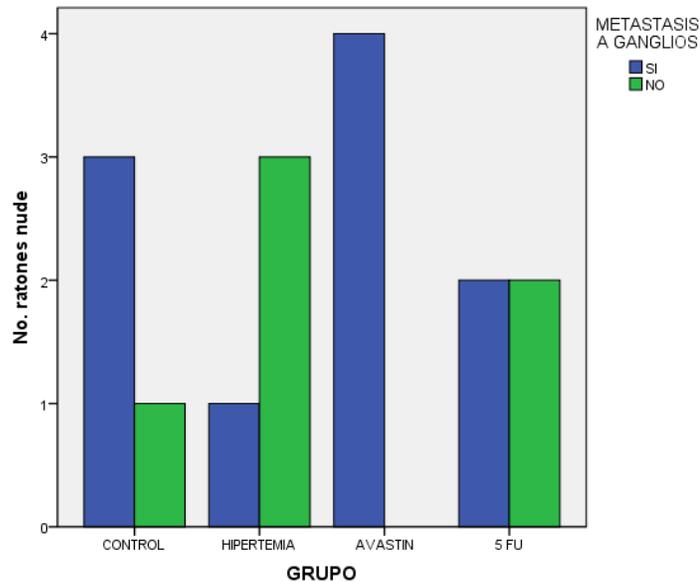


FIG. a) se observa imagen histológica de implante tumoral sobre la serosa del intestino sin infiltrarlo. B) imagen histológica con infiltración a pared intestinal HyE 10x.

GRAFICA. HISTOLOGIA DE METASTASIS GANGLIONAR EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL.



Se determino la presencia o no de metástasis ganglionares mesentéricos posterior al tratamiento; en el grupo control 3 de los ratones presenta metástasis ganglionar un solo ratón no tuvo metástasis ganglionar, del grupo hipertermia un solo ratón presenta metástasis ganglionar y 3 de los ratones no presenta metástasis ganglionar. En el grupo de bevacizumab los 4 ratones presentaron metástasis ganglionar, en el grupo de 5 flurouracilo dos ratones nude presento metástasis ganglionar y dos no la presento con una P de 0.14

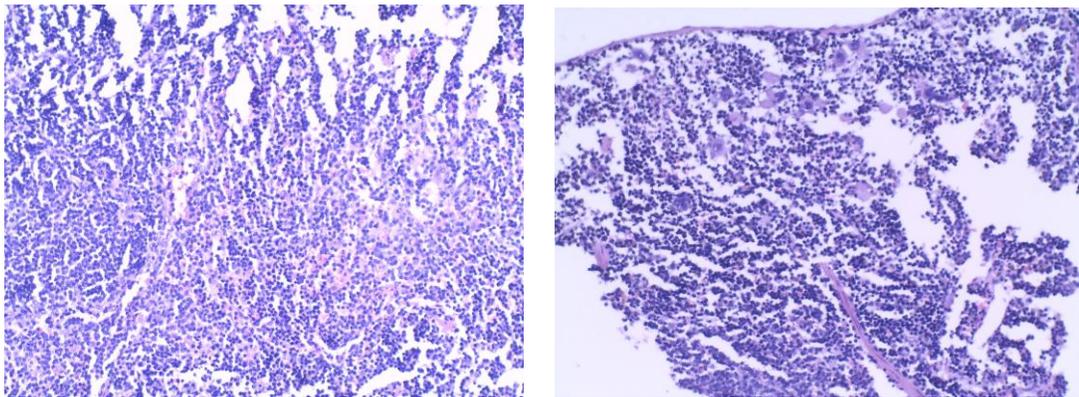
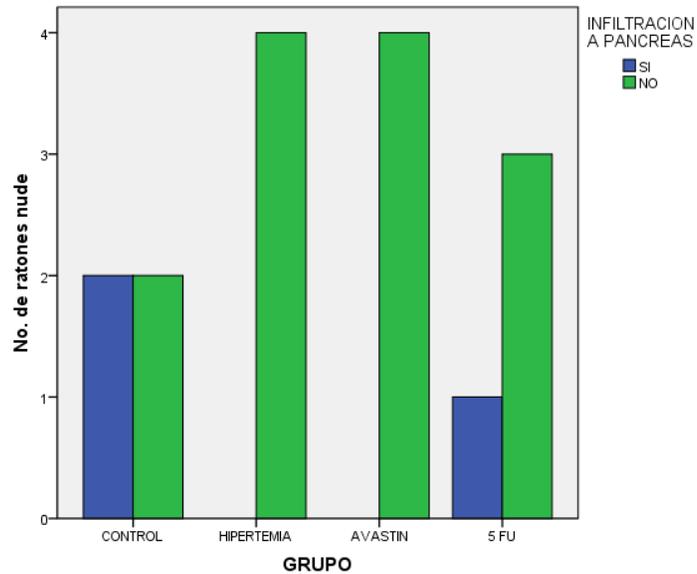


FIG. Imagen histológica con EyH a) muestra ganglio linfático sin presencia de metástasis b) ganglio linfático con múltiples células metas asicas.

GRAFICA. INFILTRACION HISTOLOGIA DEL TUMOR A PANCREAS EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL.



Se determino si infiltra o no infiltra páncreas posterior al tratamiento. En el grupo control 2 de los ratones controles infiltraron páncreas, dos de los ratones no tuvo infiltración, del grupo hipertermia ninguno de los cuatro ratones infiltra páncreas. En el grupo de bevacizumab los 4 de los ratones no presentaron infiltración pancreática, en el grupo de 5 fluorouracilo los un ratón presento infiltración y tres presentan infiltración pancreática una P de 0.21

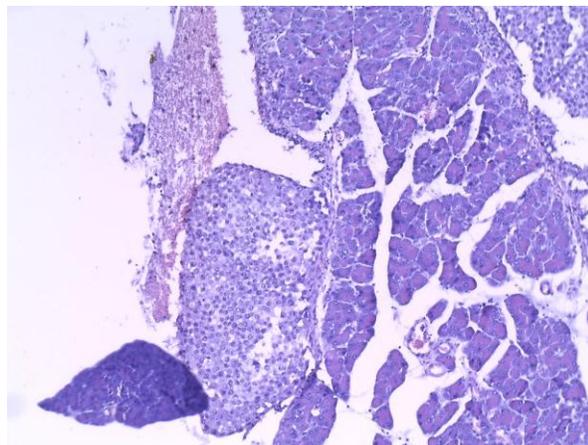
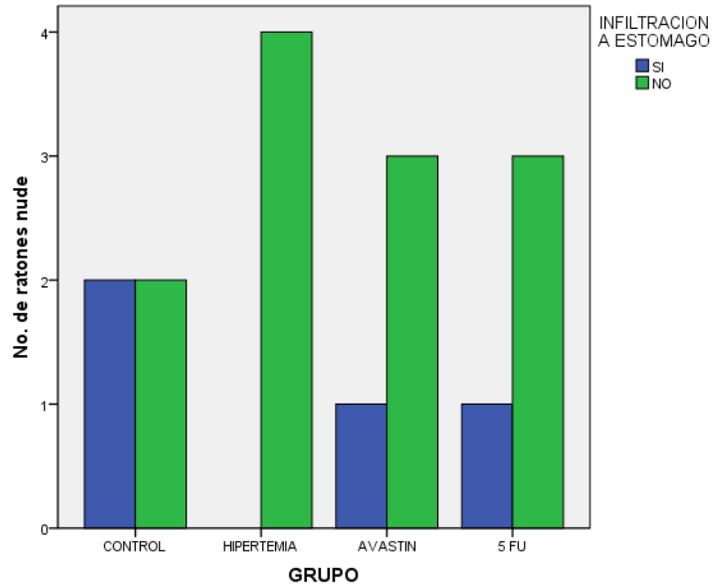


FIG. imagen histológica de un implante tumoral en contacto con páncreas sin infiltración HyE 10x.

GRAFICA. INFILTRACION HISTOLOGIA DEL TUMOR ESTOMAGO EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL.



Se determino si infiltra o no infiltra estomago posterior al tratamiento. En el grupo control 2 de los ratones controles infiltraron estomago, dos de los ratones no tuvo infiltración, el grupo de hipertermia ninguno de los cuatro ratones infiltro estomago. En el grupo de bevacizumab uno de los ratones presento infiltración a estomago y 4 de los ratones no presenta infiltración gástrica. En el grupo de 5 flurouracilo un ratón presento infiltración y tres presentan infiltración a estomago teniendo una P de 0.44

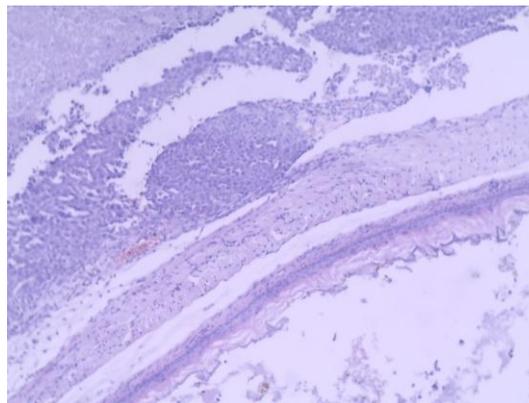
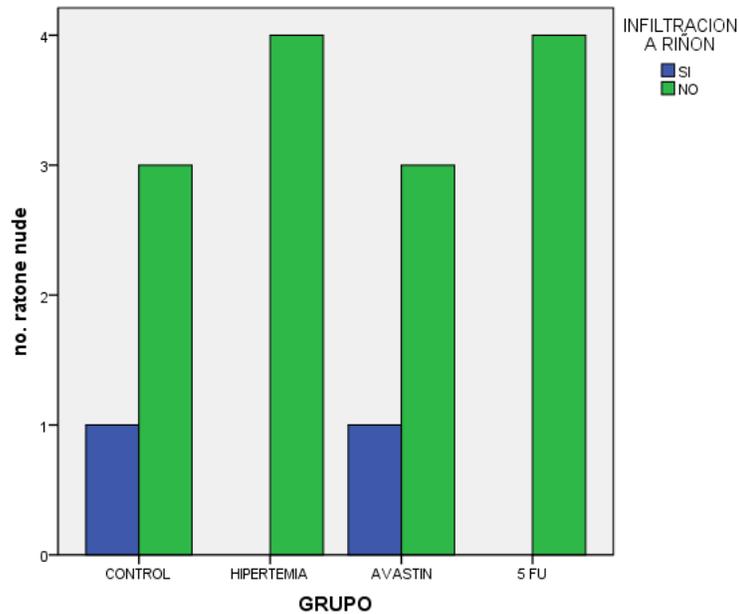


FIG. Imagen histológica de un implante tumoral adosado a al serosa del estomago pero sin infiltrarlo imagen HyE 10x.

GRAFICA. INFILTRACION HISTOLOGIA DEL TUMOR EN RIÑON EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL.



Se determino si infiltra o no infiltra riñon posterior al tratamiento. En el grupo control 1 de los ratones controles infiltraron riñon, tres de los ratones no tuvo infiltración renal, el grupo de hipertermia ninguno de los cuatro ratones infiltro riñon. En el grupo de bevacizumab los uno de los ratones presento infiltración a riñon y 4 de los ratones no presenta infiltración renal. En el grupo de 5 fluorouracilo 4 raton no presentan infiltración a riñon teniendo una P de

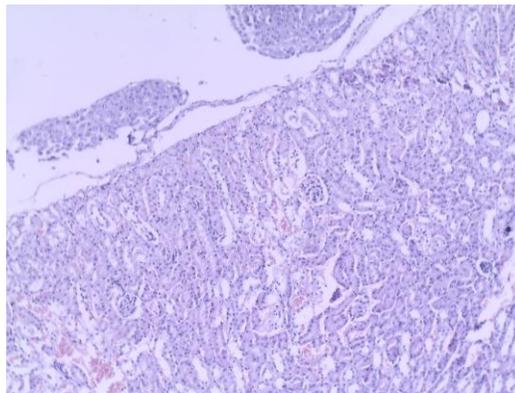
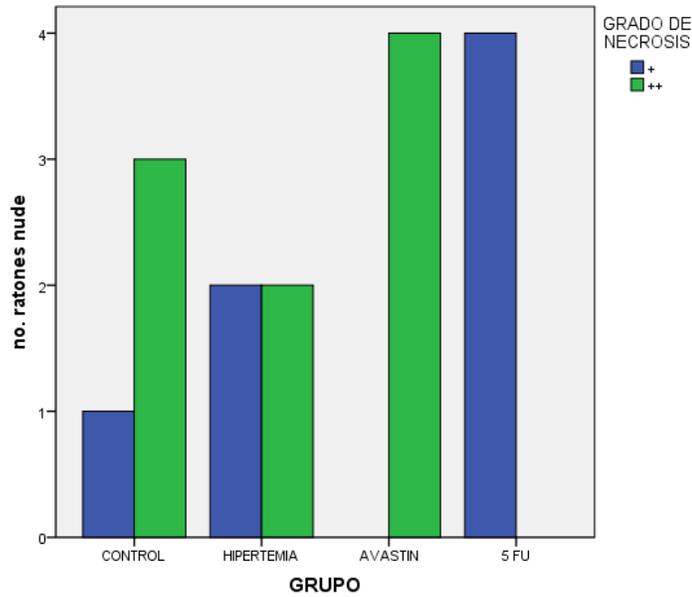


FIG. Se aprecia imagen histológica a nivel renal con múltiples glomerulos sin infiltración tumoral, se observa implante el cual no infiltra a riñon. HyE 10x.

GRAFICA. GRADO DE NECROSIS NUMORAL EN RATONES NUDE CON CARCINOMATOSIS PERITONEAL.



El grado de necrosis tumoral en el grupo control se presento en una + en uno de los ratones y en 3 de los ratones el grado de necrosis tumoral en ++ fue en 3 ratones; en el grupo de hipertermia 2 de los ratones presento necrosis tumoral leve y 2 de los ratones presento necrosis tumoral moderada. En el grupo de bevacizumab la totalidad de los ratones presento necrosis moderada y en el grupo de 5 fluracilo los cuatro ratones presento necrosis tumoral leve con una P de 0.031

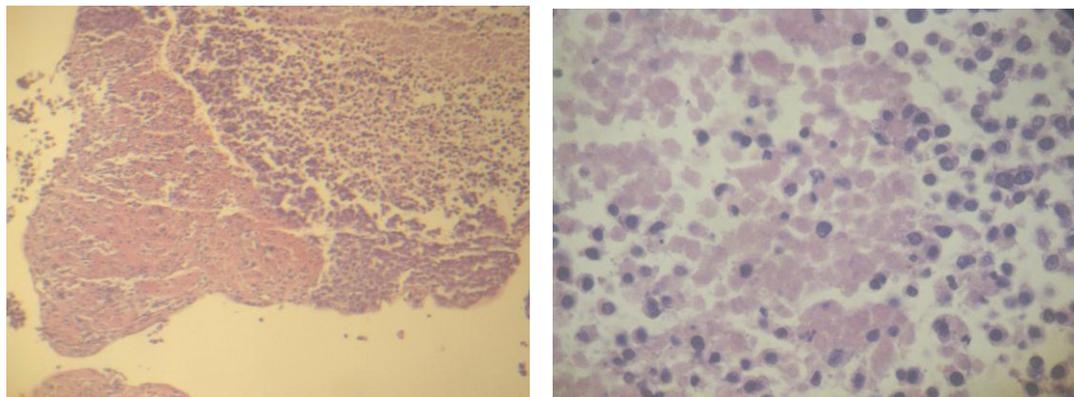


FIG. Zonas de necrosis tumoral +++ obsérvese en los cambios de coloración en el tumor imagen histológica en HyE 10x y 40x.

GRAFICA. INMUNOHISTOQUIMICA EN LA SOBRE EXPRESION DEL VEGF EN EL LA CARCINOMATOSIS PERITONEAL.

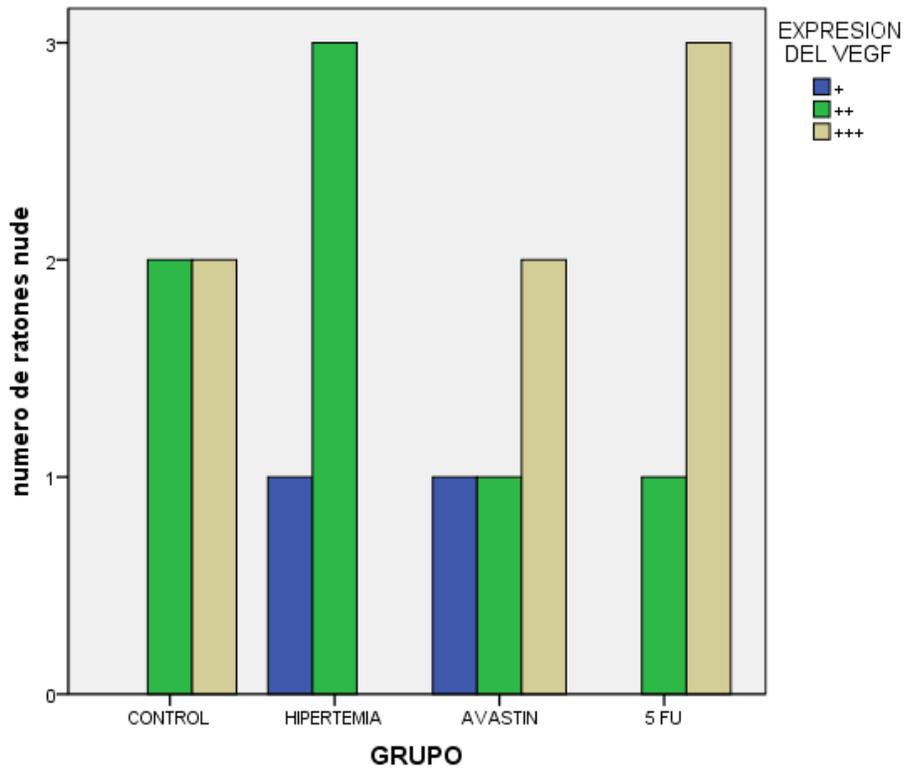


GRAFICO. Se encuentra una corroboración de la sobreexpresión de los receptores del VEGF observados por inmunohistoquímica y siendo expresados en la mayor parte de los tumores en ++ y +++, presentando una P de 0.39 haciendo a los grupos sin diferencia y similares.

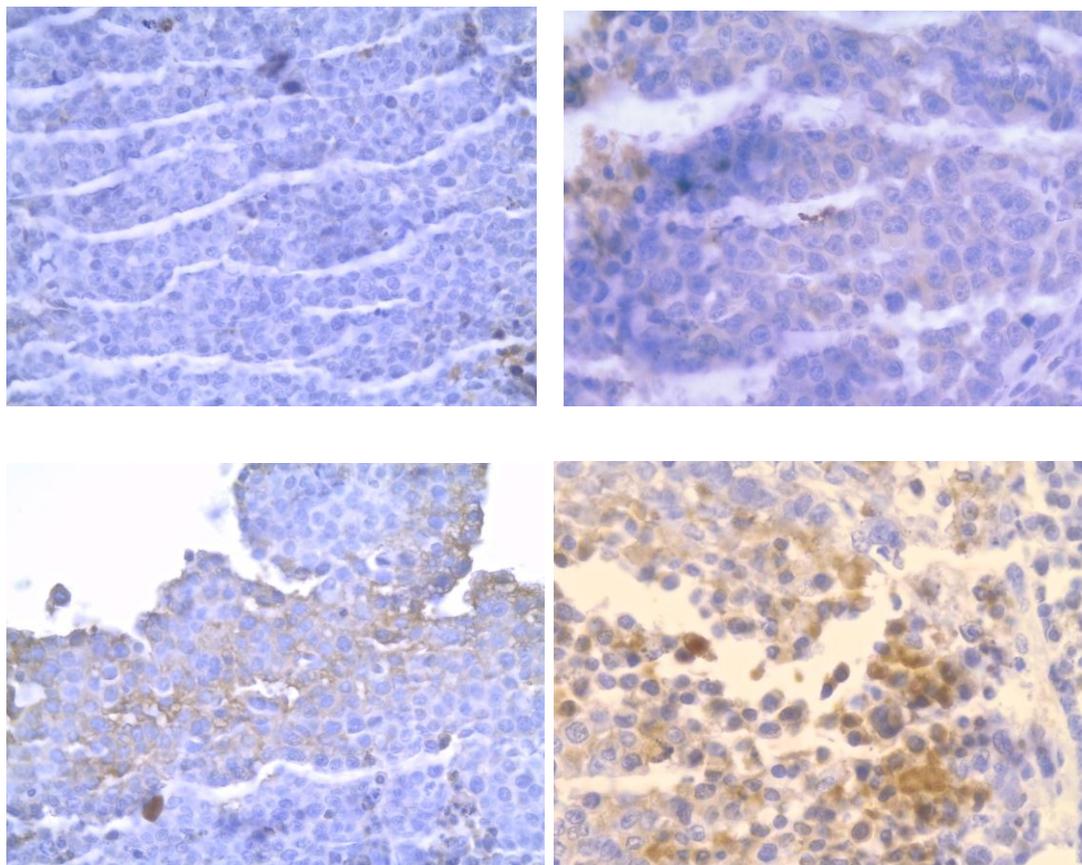


FIG. Imagen histológica con técnica de inmunohistoquímica para receptores del VEGF a) tumor negativo a receptores para VEGF b) tumor positivo + para receptores de VEGF c) tumor positivo ++ para receptores de VEGF d) tumor positivo +++ para receptores del VEGF.

## 17. DISCUSIÓN

Las células SWIP-2, fueron diseñadas para su reproducción y crecimiento in vitro así como para el estudio y tratamiento del cáncer de colon; en las distintas fases de crecimiento celular, como en la repercusión de estudios de investigación. En nuestro estudio las células SWIP-2 no son células puras, debido a que han sido mutadas y re cultivadas, esto les confiere mayor agresividad y patogenicidad, presentando índices mitóticos aumentados a lo esperado y al ser inoculadas en ratones desnudos le confiere carcinomatosis peritoneal, el cultivo recibido de inicio con un total de 80,000 células con una gran mortalidad del vial de cerca de 70% lo que lo haría en otras células, como un cultivo no viable, sin embargo el cultivo se presentó y desarrollo de una forma inusual, debido a que alcanzamos una índice de mitosis de 1 por cada 12 hrs, obteniendo una respuesta al cultivo excelente y tolerando adecuadamente el cambio de medio, el cambio de caja de cultivo, el despegamiento y sobretodo presentando una mortalidad del 2 % máxima en todos los recambios. Alcanzando el plazo previsto del total celular en 7 días, al continuar el cultivo y el número total de células obtenidas llegó hasta 120, 000,000 de células. Estas células tienen la característica de formación de una bicapa y que a pesar del porcentaje elevado de confluencia en caja de cultivo, el crecimiento se detiene lentamente, en su fase de mayor crecimiento fueron necesarios recambios de medio de cultivo cada 24 hrs. El cambio de coloración del medio por la falta de nutrientes. Consideramos que la metodología utilizada y seguida por este estudio fue muy adecuada para el desarrollo y el crecimiento celular de estas células y así alcanzamos la siguiente fase del estudio la implantación.

Una vez implantadas las células en el interior de la cavidad peritoneal del ratón nude homocigótico, las células Caco-2 tienen un crecimiento libre de respuesta inmune por células T, muy dependiente de las características celulares. En la gran parte de estudios realizados por investigadores en el área oncológica con ratones nude homocigóticos se tiene un índice de éxito del 40 a 50 % en la implantación, en nuestro estudio el 100% de los ratones nude homocigóticos implantados

intraperitonealmente fueron exitosos, presentando índices de carcinomatosis peritoneal homogéneo y aceptables para el objetivo de este estudio, haciendo este modelo de implantación con estas células de una gran efectividad. Presentando un tiempo de latencia para el inicio de carcinomatosis y formación de ascitis a partir del 8vo día posterior a la inoculación disminuyendo esto en comparación con otros estudios que utilizaron el mismo inóculo de los 10 hasta los 13 días en estudios previos realizados, en nuestro estudio la afección macroscópica por órgano se afectaron en su totalidad el estómago, intestino, mesenterio y peritoneo parietal y no siendo valorados los órganos retroperitoneales como el páncreas, ganglios retroperitoneales, riñón y uréteres; en ninguno de los casos el hígado se vio afectado macroscópicamente en la evaluación inicial.

El aumento del perímetro abdominal es uno de los parámetros indirectos para medir la cantidad de ascitis de un paciente por carcinomatosis peritoneal. La cual se correlaciona con un procedimiento de paracentesis cuando el paciente presenta datos de restricción, en este estudio se corrobora dicha relación con los ratones nude y el grado de ascitis medida, la mayor parte de los síntomas de un paciente con carcinomatosis es por la compresión y restricción que ejerce el líquido dentro de la cavidad abdominal motivo por el cual al drenarlo mejoran los síntomas, En este estudio se realiza en la cirugía drenaje y secado de cavidad abdominal. Como la medición del índice de carcinomatosis peritoneal el cual objetivita en un paciente que cantidad de la pared peritoneal está afectada y su probable respuesta al tratamiento, en el humano contamos 1 a lesiones no mayores de 25 mm 2 de 25 a 50 mm y 3 por arriba de esta medida, y se multiplica por el número de zonas en peritoneo afectadas dándonos un índice de carcinomatosis mayor de 39. En el ratón modificamos el índice de carcinomatosis y tomamos que todas las lesiones tuvieran el valor de 1 motivo por el cual que el mayor índice de carcinomatosis presentado en el ratón nude es de 13 haciendo homogéneo los grupos presentando una media de 10 puntos. En el humano los sitios en donde mayor cantidad de implantes peritoneales se encuentran son en hemidiafragma derecho, puntos declives como son el hueco pélvico y fondos de saco; por donde transcurre el líquido peritoneal en correderas

parietocolicas y zonas de fijación intestinal como son el ángulo de treitz y el ciego. Explicando con ello la mayor parte de las lesiones concentradas en nuestro estudio.

Observamos que los parámetros clínicos en los animales son difíciles de catalogar y separar mas sin embargo encontramos que si hay una diferencia importante sobre todo en aquellos grupos en donde se utiliza la hipertermia como tratamiento tanto como sola o en compañía de medicamento, en el manejo sin hipertermia con bevacizumab las condiciones clínicas de los ratones fueron mejores en los aspectos medidos como fue la actividad física y la ingesta de alimentos y bebidas siendo estadísticamente significativa. Y del grupo de hipertermia notamos una baja importante en la ingesta de alimento y bebida no presentando esta el grupo de bevacizumab pero esta con una P de 0.13 y teniendo estos resultados un importante impacto en la mortalidad y sobrevida de los ratones en los diferentes grupos. Se realizo el seguimiento de los ratones hasta su muerte, la mayor parte de estos con deterioro sistémico importante con datos de caquexia y con ascitis a tensión la cual no se drena hasta el momento de la muerte, hay una similitud muy importante entre los dos grupos que tuvieron deterioro clínico como el grupo de hipertermia y el grupo de 5 flurouracilo, presentando mortalidades tempranas de la mínima 2 días posteriores a la cirugía y la sobrevivencia mayor de 7 días, muy por debajo del grupo control. Mas sin embargo encontramos una diferencia importante y significativa en la sobrevida sobre todos los grupos en base al los ratones manejados con bevacizumab y sobre todo en la comparación con el grupo control, que alcanzo sobrevida medias de 25 días posteriores al evento quirúrgico y máximas sobrevidas de 32 días posteriores al evento, y sobre todo en las condiciones de vida presentadas al momento de la muerte en relación al grupo control. Hay poco escrito sobre el aumento en la sobrevida y la calidad de vida del paciente con carcinomatosis peritoneal. Presentándose casos clínicos y algunas series de casos no bien protocolizados, pero con resultados alentadores sobre todo en la disminución de la producción de liquido de ascitis y los síntomas acompañantes y la prolongación de la sobrevida, en este estudio experimental se demuestra el gran impacto en la sobrevida manejado con bevacizumab en comparación con el grupo de hipertermia, 5 flurouracilo e inclusive el grupo control.

Los estudios de imagen en la actualidad para el diagnóstico de carcinomatosis peritoneal son muy controversiales no realizándose de forma rutinaria y presentándose en algunos casos como hallazgos incidentales y poco predecibles. Incluso presentando estudios negativos por imagen y pacientes que sometidos a laparotomías exploradoras presentan índices de carcinomatosis peritoneal elevados y siendo diagnosticados hasta este momento con el advenimiento de la resonancia magnética nuclear y la tomografía por emisión de positrones se espera mejorar los índices de diagnóstico por imagen de la carcinomatosis peritoneal siendo capaz de observar lesiones de hasta 3 mm de diámetro. En nuestro estudio se tomó una muestra única del grupo bevacizumab y control y se comparó con una resonancia magnética de un ratón sin carcinomatosis. No fue posible la toma de resonancia magnética a todos los grupos porque esta fue realizada siete días posteriores al evento quirúrgico y 22 días de haber inoculado las células dentro del peritoneo. Siendo uno de los parámetros a observar la confluencia de las lesiones peritoneales en el grupo control y el aumento en el tamaño de dichas lesiones así como la cantidad de líquido de ascitis observada.

Dentro de los estudios histológicos realizados, se demuestra la infiltración a los diferentes órganos intraabdominales y las metástasis a ganglios linfáticos presentados; en la carcinomatosis peritoneal de los tumores coloniales se presenta en un inicio como una etapa locoregional, en donde la actividad tumoral es presentada mediante la exposición y la infiltración del tumor a la serosa y su contacto con el peritoneo ricamente vascularizado por la barrera peritoneo plasmática y llevada a distancia por el flujo normal del líquido peritoneal realizando siembras a distancia. Por lo general estas siembras pueden ser removidas son macroscópicamente visibles por la cirugía radical y siembras microscópicas mediante el manejo de medicamentos intraperitoneales. Pero de no ser manejadas adecuadamente de ser una enfermedad localmente avanzada se hace sistémica y continua con infiltración a nivel abdominal de diferentes órganos y la presencia de aumento en índice de metástasis a ganglios y a distancia, en este estudio debido a que el manejo primordial fue en base medicamentos intraperitoneales y no haber realizado una cirugía radical la enfermedad macroscópica persistiría y por consiguiente la infiltración a los distintos

órganos. Cabe resaltar que al momento de observar al microscopio son piezas de patología consecuentes a la muerte de los ratones y que dichas muertes se presentaron en distintos tiempos dependientes de los resultados de supervivencia en los diferentes grupos, de los resultados hacemos un comparativo histológico en base a lo infiltrado y no infiltrado dependiendo del tiempo y el manejo establecido por grupo. Se pliega como resultado de infiltración hepática que el grupo de hipertermia y 5 fluorouracilo son los que menor infiltración hepática presentaron en comparación con el grupo control. Mas sin embargo el grupo de bevacizumab fue menor la cantidad de ratones nude con carcinomatosis que infiltraron hígado, pese a que el tiempo de exposición de la carcinomatosis por el aumento de la supervivencia es mayor. Con resultados muy similares en los distintos órganos revisados como son intestino, páncreas y estomago. Siendo estadísticamente significativa y haciendo una comparación del grupo de bevacizumab y el grupo control.

Se midió el grado de necrosis tumoral presentada por histología, hay varias consecuencias de que un tumor presente distintos grados de necrosis uno de ellos es que el tumor presente un crecimiento demasiado acelerado para que en sus porciones apicales no llegue suficiente aporte sanguíneo con la subsecuente necrosis. Otra de las causas es el bloqueo de la angiogénesis y vasculogénesis evitando la formación de nuevos vasos sanguíneos para el aporte nutricional del tumor, su desarrollo y su disminución en el tamaño. Medimos los grados de necrosis en leve y moderada por histología. Encontramos que en los grupos manejados con 5 fluorouracilo presentan niveles leves de necrosis tumoral muy similar a lo encontrado en el grupo de hipertermia. En el grupo control presentaron valores de necrosis moderada y leve tendiendo a la necrosis moderada pero la totalidad del grupo de bevacizumab presentó necrosis tumoral moderada, este resultado es reflejado a las dos distintas teorías la primera por el crecimiento acelerado de una carcinomatosis bien instaurada y la segunda por la disminución y el bloqueo de los receptores del VEGF y como resultado del mismo la disminución en la angiogénesis tumoral, el aporte nutricional y el aumento de la necrosis tumoral. Ya muy bien establecido la función de este anticuerpo monoclonal en distintas neoplasias; pero con muy poca evidencia de la efectividad en la aplicación intraperitoneal de la carcinomatosis.

La medición y el estudio de aquellos tumores que sobre expresan receptores para el VEGF está bien establecido, así como la respuesta antitumoral muy importante en el tratamiento sistémico de distintas neoplasias, tanto resultados clínico como de respuestas completas al tratamiento. Es este estudio nos dimos a la tarea de realizar el grado de sobreexpresión de receptores para el VEGF catalogándolo como leve +, moderado ++, intensa +++, y haciendo una asociación con la respuesta clínica y tumoral en los distintos grupos, encontrando que la mayor parte de los tumores sobre expresa por inmunohistoquímica receptores para VEGF de forma moderada e intensa en un porcentaje equitativo, es importante describir que ninguno de los tumores fue negativo a la sobreexpresión de receptores a VEGF y sobre todo los que pertenecen al grupo de bevacizumab.

## **18. CONCLUSION**

- 1.- Los cultivos de células SWIP-2 obtenidas de cáncer de colon de humano son una población celular homogénea, caracterizada por adhesión a la caja de cultivo con presentando escasa mortalidad in vitro.**
- 2.- Las células SWIP-2 presentan alta agresividad biológica, haciendo que los cultivo pese a los puntos en contra, fueran muy exitosos logrando conseguir índices mitóticos elevados, logrando que el tiempo de cultivo esperado se acertara.**
- 3.- La inoculación con células SWIP-2 en el peritoneo de ratones nude en una cantidad de 2, 500,000 es adecuada para inducir la patogenia de estas células in vivo, provocando que el 100 % de los inoculo presenten carcinomatosis peritoneal.**
- 4.- Los cuatro grupos de experimentales no presentan diferencia significativa en la medición del perímetro abdominal y cuantificación del liquido de ascitis por carcinomatosis peritoneal haciéndolos grupos homogéneos.**
- 3.- En el manejo de la carcinomatosis peritoneal en el ratón nude con carcinomatosis peritoneal, encontramos un deterioro clínico en base a la actividad y la ingesta de alimentos, en los grupos que se utilizo como manejo la hipertermia no siendo así en los grupos con tratamiento en base a normo termia.**
- 4.- El manejo con Bevacizumab en este estudio aumento significativamente la sobrevida, así como mejoró las condiciones clínicas de los ratones nude con carcinomatosis peritoneal, siendo que no es un medicamento que se utilice en los esquemas actuales de tratamiento intraperitoneal, con grandes expectativas, es importante realizar más estudios para valorar la respuesta tumoral en pacientes con carcinomatosis peritoneal. Con posibles resultados muy prometedores.**
- 5.- La RMN es un estudio muy útil para determinar lesiones de hasta 2 mm de diámetro, así como otros datos indirectos de carcinomatosis peritoneal como es el aumento de perímetro abdominal, liquido de ascitis y el engrosamiento de la pared.**
- 6.- El tratamiento con bevacizumab demostró la disminución en la infiltración tumoral en los órganos abdominales con respecto al grupo control, a pesar del tiempo de exposición de la carcinomas peritoneal, siendo mayor para el grupo de bevacizumab.**

**7.- Se comprobó la sobreexpresión de los receptores para el VEGF en los ratones nude con carcinomas peritoneal por cáncer de colon y su probable correlación clínica al bloqueo a estos receptores por el grupo tratado con bevacizumab. Con ello disminuyendo el tamaño del tumor así como la disminución de la cantidad de líquido de ascitis y por consiguiente el aumento en la sobrevida.**

**8.- Se comprobó la respuesta clínica, en sobrevida, histológica, en ratones con Células SWIP-2, las cuales presentan agresividad biológica más intensa, que los podría brindar beneficios importantes el manejo de estos pacientes.**

**19. BIBLIOGRAFIA**

1. Griffiths CT, Parker LM, Fuller AF Jr. Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer. *Cancer treat Rep* 1979;63:235-240.
2. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ. Secondary cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer. A prospective study. *Cancer* 1995;76:1606-1614.
3. Sandeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al. Peritoneal carcinomatosis from non gynecologic malignancies: Results of the EVOCAPE 1 Multicentric prospective study. *Cancer* 2000;88:358-363.
4. Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, et al. Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in the Management of Peritoneal Surface Malignancies of Colonic Origin: A Consensus Statement. *Ann Surg Oncol* 2007;14:128-133.
5. Sugarbaker PH. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol* 1998;14:254-261.
6. Sugarbaker PH, Chang D. Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy. *Ann Surg Oncol* 1999;6:727-731.
7. Glehen O, Mithieux F, Osinsky D, Beaujard AC, Freyer G, Guertsch Ph, Francois Y, Peyrat P, Panteix G, Vignal J, Gilly F. Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: a phase II study *J Clin Oncol* 2003;21(5):799-806.
8. Verwall V, van Ruth S, de Bree E, van Slooten W, van Tinteren H, Boor H, Zoetmulder F. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:3737-43.
9. Takahashi T, Emi Y, Hasuda S, Kakeji Y, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors. *Surgery* 2002;131:573-84.
10. Weissberger AS, Levine B, Storaasli JP. Use of nitrogen mustard in treatment of serous effusions of neoplastic origin. *JAMA*. 1955;159:1704-7
11. Dedrick RL, Myers CE, Bungay PM, DeVita Jr. Pharmacokinetic rationales drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat Rep*. 1978;62:1-9.
12. Katz MH, Barone RM. The rationales of perioperative intraperitoneal chemotherapy in the treatment of peritoneal surface malignancies. *Surg Oncol Clin North Am*. 2003;12:673-88.
13. She P, Levine EA, Hall J, Case D, Russell G, Fleming R, et al. Factors predicting survival after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy

- mitomicyn C after cytoreductive surgery for patients with peritoneal carcinomatosis. *Arc Surg.* 2003;138:26-33.
14. Witkamp AJ, De Bree E, Van Goethem AR, Zoetmulder FAN. Antitumour treatment. Rationale and techniques of intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2001;27:365-74.
  15. Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JC, Wesley R, Barofsky I, Meyers CE. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluoracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Surgery.* 1985;98:414-21.
  16. Gilly FN, Sayag AC, Carry PY, Brillon G, Roche M, James I, et al. Chimio-hiperthermie intra-peritoneale (CHIP) dans le traitement des carcinomes peritoneales d'origine digestive. Rapport d'une observation et données physiopathologiques. *J Chris (Paris).* 1990;127:95-8.
  17. Fujimoto S, Shrestha RD, Kokubun M, Ohta M, Takahashi M, Kobayashi K, et al. Intraperitoneal hyperthermic perfusion combined with surgery effective for gastric cancer patients with peritoneal seeding. *Ann Surg.* 1988;208:36-41.
  18. Koga S, Hamazoe R, Maeta M, Shimizu N, Murakami A, Wakatsuki T. Prophylactic therapy for peritoneal recurrence of gastric cancer by continuous hyperthermic peritoneal perfusion with mitomycin C. *Cancer.* 1988;61:232-7.
  19. Sugarbaker PH. It's what the surgeon doesn't see that kill the patient. *J Nippon Med Sch.* 2000;67:5-8.
  20. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Surg Oncol Clin North Am.* 2003;12:703-27.
  21. Elias D, Dube P, Bonvalot S, Meshaka P, Manain M, Cavalcanti A, et al. Treatment of liver metastases with moderate peritoneal carcinomatosis by hepatectomy and cytoreductive surgery followed by immediate postoperative intraperitoneal chemotherapy; feasibility and preliminary results. *Hepatogastroenterol.* 1999;46:360.
  22. Sticca RP, Dach BW. Rationale for hyperthermia with intraoperative intraperitoneal chemotherapy agents. *Surg oncol Clin N Am.* 2003;12:689-801.
  23. Shido A, Ohmura S, Yamamoto K, Konayashi T, Fujimura T, Yonemura Y. Does hyperthermia induce peritoneal damage in continuous hyperthermic peritoneal perfusion. *World J Surg.* 2000;24:507-11.
  24. Spratt JS, Adcock RA, Sherrill W, Travathen S. Hyperthermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res.* 1980;40:53-255.
  25. Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M, Sherrill W, Mckeown J. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res.* 1980;40:2563-655.
  26. Stuart OA, Stephens AD, Welch L, Sugarbaker PH. Safety monitoring of the coliseum technique for heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy with mitomycin C. *Ann Surg Oncol.* 2002;9:186-91.

27. Gertsch P. A historical perspective on colorectal liver metastases and peritoneal carcinomatosis: similar results, different treatments. *Surg Oncol Clin North Am.* 2003;12:531-41.
  28. Sugarbaker PH. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:576-587.
  29. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg.* 1995;221:29-42.
  30. Yonemura Y. Principles of the Treatment of peritoneal dissemination. En: Yonemura Y, editor. *Peritoneal Dissemination-molecular mechanisms and the latest therapy.* Kanazawa, Japan: Maeda Shoten Co.,Ltd;1998.p.175-90.
  31. Dubé P, Lasser Ph, Elias D. Traitement de la carcinose peritoneale d'origine colorectal. *J Chir (Paris).* 1997;134:233-6.
  32. Elias DM, Pocard M. Treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Surg Oncol Clin North Am:*2003;12:543-59.
  33. Gilly FN. Rationale for peritonectomy and perioperative intraperitoneal chemotherapy. Peritoneal surface malignancy. Third Biannual Masterclass in peritoneal Surface malignancy. Basingstoke:2002.
  34. Sugarbaker PH. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbeck's Arch Surg.* 1999;384:576-87.
  35. Esquivel J.FACS Cytoreductive Surgery for Peritoneal Malignancies Development of Standars of Care for Community. *Surg Oncol Clin N Am* 2007;16:653-666.
  36. Pommel C, Appleyard TL, Gouy S, et al. the role of laparoscopy to evaluate candidates for complete cytoreduction of peritoneal carcinomatosis and hypertermic intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:540-543.
  37. Sugarbaker PH, Ronnet B, Archer A, et al. pseudomyxoma peritoneal syndrome. *Adv Surg* 1996;30:233-280.
  38. Sugarbaker PH, Peritonectomy procedures. *Can Treat Res* 2007;134:247-264.
  39. Sugarbaker PH. Peritonectomy Procedures. *Surg Oncol Clin N Am.*2003;12:703-727.
  40. Spratt JS, Adcock RA, Sherrill W, Travathen S. Hypertermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res* 1980;40:253-255.
  41. Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M et al. Clinical delivery system for intraperitoneal hypertermic chemotherapy. *Cancer Res* 1980;40:256-260.
  42. Elias D, Damia E, Puizillout J et al. thermic homogeneity and standardization of intraperitoneal chemohyperthermia for peritoneal carcinomatosis. *Reg Cancer Treat* 1996;9:54-59.
  43. Tsiftis D, de Bree E, Romanos J et al. Peritoneal expansion by artificially produced ascites during perfusion chemotherapy. *Arch Surg* 1999;134:545-549.
- Glehen O, Osinsky D, Cotte E et al. intraperitoneal chemohyperthermia. Using a closed abdominal procedure for the treatment of peritoneal

44. Griffiths CT, Parker LM, Fuller AF Jr. Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer. *Cancer treat Rep* 1979;63:235-240.
45. Eisenkop SM, Friedman RL, Wang HJ. Secondary cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer. A prospective study. *Cancer* 1995;76:1606-1614.
46. Sandeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al. Peritoneal carcinomatosis from non gynecologic malignancies: Results of the EVOCAPE 1 Multicentric prospective study. *Cancer* 2000;88:358-363.
47. Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, et al Cytoreductive Surgery and Hypertermic Intraperitoneal Chemoterapy in the Mangement of Peritoneal Surface Malignancies of Colonic Origin: A Consensus Statement. *Ann Surg Oncol* 2007;14:128-133.
48. Sugarbaker PH. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol* 1998;14:254-261.
49. Sugarbaker PH, Chang D. Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy. *Ann Surg Oncol* 1999;6:727-731.
50. Glehen O, Mithieux F, Osinsky D, Beaujard AC, Freyer G, Guertsch Ph, Francois Y, Peyrat P, Panteix G, Vignal J, Gilly F. Surgery combined with peritonectomy procedures and intraperitoneal chemohyperthermia in abdominal cancers with peritoneal carcinomatosis: a phase II study *J Clin Oncol* 2003;21(5):799-806.
51. Verwall V, van Ruth S, de Bree E, van Slooten W, van Tinteren H, Boor H, Zoetmulder F. Randomized trial of cytoreduction and hypertermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:3737-43.
52. Takahashi T, Emi Y, Hasuda S, Kakeji Y, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical application of hipertermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors. *Surgery* 2002;131:573-84.
53. Weissberger AS, Levine B, Storaasli JP. Use of nitrogen mustard in treatment of serous effusions of neoplatic origin. *JAMA*. 1955;159:1704-7
54. Dedrick RL, Myers CE, Bungay PM, DeVita Jr. Pharmacokinetic rationales drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Tret Rep*. 1978;62:1-9.
55. Katz MH, Barone RM. The rationales of perioperative intraperitoneal chemotherapy in the treatment of peritoneal surface maloingnacies. *Surg Oncol Clin North Am*. 2003;12:673-88.
56. She P, Levine EA, Hall J, Case D, Rusell G, Fleming R, et al. Factors predicting survical after intraperitoneal hypertermic chemotherapy with

- mitomicyn C after cytoreductive surgery for patients with peritoneal carcinomatosis. *Arc Surg.* 2003;138:26-33.
57. Witkamp AJ, De Bree E, Van Goethem AR, Zoetmulder FAN. Antitumour treatment. Rationale and techniques of intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2001;27:365-74.
  58. Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JC, Wesley R, Barofsky I, Meyers CE. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluoracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Surgery.* 1985;98:414-21.
  59. Gilly FN, Sayag AC, Carry PY, Brillon G, Roche M, James I, et al. Chimio-hipertermie intra-peritoneale (CHIP) dans le traitement des carcinoses peritoneales d'origine digestive. Rapport d'une observation et données physiopathologiques. *J Chris (Paris).* 1990;127:95-8.
  60. Fujimoto S, Shrestha RD, Kokubun M, Ohta M, Takahashi M, Kobayashi K, et al. Intraperitoneal hyperthermic perfusión combined with surgery effective for gastric cáncer patients with peritoneal seeding. *Ann Surg.* 1988;208:36-41.
  61. Koga S, Hamazoe R, Maeta M, Shimizu N, Murakami A, Wakatsuki T. Prophylactic therapy for peritoneal recurrence of gastric cancer by continous hyperthermic peritoneal perfusion eith mitomycine C. *Cancer.* 1988;61:232-7.
  62. Sugarbaker PH. It's what the surgeon doesn't see that kill the patient. *J Nippon Med Sch.* 2000;67:5-8.
  63. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Surg Oncol Clin North Am.*2003;12:703-27.
  64. Elias D, Dube P, Bonvalot S, Meshaka P, Manain M, Cavalcanti A, et al. Treatment of liver metastases with moderate peritoneal carcinomatosis by hepatectomy and cytorreductive surgery followed by immediate postoperative intraperitoneal chemotherapy; feasibility and preliminary results. *Hepatogastroenterol.* 1999;46:360.
  65. Sticca RP, Dach BW. Rationale for hyperthermia with intraoperative intraperitoneal chemotherapy agents. *Surg oncol Clin N Am.*2003;12:689-801.
  66. Shido A, Ohmura S, Yamamoto K, Konayashi T, Fujimura T, Yonemura Y. Does hyperthermia induce peritoneal damage in continous hyperthermic peritoneal perfusion. *World J Surg.* 2000;24:507-11.
  67. Spratt JS, Adcock RA, Sherill W, Travathen S. Hyperthermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res.* 1980;40:53-255.
  68. Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M, Sherrill W, Mckeown J. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res.* 1980;40:2563-655.
  69. Stuart OA, Stephens AD, Welch L, Sugarbaker PH. Safety monitoring of the coliseum technique for heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy with mitomycin C. *Ann Surg Oncol.* 2002;9:186-91.

70. Gertsch P. A historical perspective on colorectal liver metastases and peritoneal carcinomatosis: similar results, different treatments. *Surg Oncol Clin North Am.* 2003;12:531-41.
71. Sugarbaker PH. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:576-587.
72. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg.* 1995;221:29-42.
73. Yonemura Y. Principles of the Treatment of peritoneal dissemination. En: Yonemura Y, editor. *Peritoneal Dissemination-molecular mechanisms and the latest therapy.* Kanazawa, Japan: Maeda Shoten Co.,Ltd;1998.p.175-90.
74. Dubé P, Lasser Ph, Elias D. Traitement de la carcinose peritoneale d'origine colorectal. *J Chir (Paris).* 1997;134:233-6.
75. Elias DM, Pocard M. Treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Surg Oncol Clin North Am:*2003;12:543-59.
76. Gilly FN. Rationale for peritonectomy and perioperative intraperitoneal chemotherapy. Peritoneal surface malignancy. Third Biannual Masterclass in peritoneal Surface malignancy. Basingstoke:2002.
77. Sugarbaker PH. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbeck's Arch Surg.* 1999;384:576-87.
78. Esquivel J.FACS Cytoreductive Surgery for Peritoneal Malignancies Development of Standars of Care for Community. *Surg Oncol Clin N Am* 2007;16:653-666.
79. Pommel C, Appleyard TL, Gouy S, et al. the role of laparoscopy to evaluate candidates for complete cytoreduction of peritoneal carcinomatosis and hypertermic intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:540-543.
80. Sugarbaker PH, Ronnet B, Archer A, et al. pseudomyxoma peritoneal syndrome. *Adv Surg* 1996;30:233-280.
81. Sugarbaker PH, Peritonectomy procedures. *Can Treat Res* 2007;134:247-264.
82. Sugarbaker PH. Peritonectomy Procedures. *Surg Oncol Clin N Am.*2003;12:703-727.
83. Spratt JS, Adcock RA, Sherrill W, Travathen S. Hypertermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res* 1980;40:253-255.
84. Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M et al. Clinical delivery system for intraperitoneal hypertermic chemotherapy. *Cancer Res* 1980;40:256-260.
85. Elias D, Damia E, Puizillout J et al. thermic homogeneity and standardization of intraperitoneal chemohyperthermia for peritoneal carcinomatosis. *Reg Cancer Treat* 1996;9:54-59.
86. Tsiftis D, de Bree E, Romanos J et al. Peritoneal expansion by artificially produced ascites during perfusion chemotherapy. *Arch Surg* 1999;134:545-549.
87. Glehen O, Osinsky D, Cotte E et al. intraperitoneal chemohyperthermia. Using a closed abdominal procedure for the treatment of peritoneal

- carcinomatosis: Morbidity and mortality analysis of 216 consecutive procedures. *Ann Surg Oncol* 1999;6:790-796.
88. Stephens AD, Alderman R, Chang D et al. Morbidity and mortality of 200 treatments with cytoreductive surgery and hypertermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy using the coliseum technique. *Ann Surg Oncol* 1999.; 6:790-796.
  89. Elias D, Antoun S, Goharin A et al. Research on the best chemohyperthermia technique of treatment of peritoneal carcinomatosis after complete resection. *Int J Surg Investig* 2000;1:431-439.
  90. Elias D, Matsuhisa T, Sideris L, G. Liberale, L. Drouard-Troalen, B. Raynard, et al. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin plus irotecan after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics, tissue distribution and tolerance. *Ann Oncol* 2004;15:1558-1565.
  91. Jacquet P, Averbach A, Stephens AD, Stuart OA, Chang D, Sugarbaker PH. Heated intraoperative intraperitoneal mitomicyn C and early postoperative intraperitoneal 5-fluoracil: pharmacokinetic studies. *Oncology*. 1998;55:130-8.
  92. Wientjes MG, Badalament RA, Wang RC, Hassan F, Au JL. Penetration of mitomicyn C in human bladder. *Cancer Res*. 1993;53:3314-20.
  93. Elias D, El Otmany A, Bonnay M, Pci A, Ducreux M, Antoun S, et al. Human Pharmacokinetic study of heated intraperitoneal oxaplatin in increasingly hypotonic solution after complete resection of peritoneal carcinomatosis. *Oncology*. 2002;63:346-52.
  94. Elias DM, Sideris L. Pharmacokinetics of heated intraoperative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis. *Surg Oncol Clin N Am*. 2003;12:755-69.
  95. De Bree E, Witkamp A, Zoetmulder FAN. Intraperitoneal chemotherapy for colorectal cancer (revision). *J Surg Oncol*. 2002;79:46-61.
  96. Pestieau SR, Sugabaker PH. Treatment of primary colon cancer with peritoneal carcinomatosis, comparasion of concomitant vs delayed management. *Dis Colon rectum*. 2000;43:1341-8
  97. Gómez Portilla A, Sugarbaker PH, Chang D. Second-look surgery after cytoreduction and intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer; analysis of prognosis features. *World J Surg*. 1999;23:23-9.
  98. Gómez Portilla A, Deraco M, Sugarbaker PH. Clinical pathway for peritoneal carcinomatosis from colon and rectal cancer: guidelines for current practice. *Tumori*. 1997;83 Sppl:725-8.
  99. Jacquet P, Stephens AD, Averbach AM, Chang D, Ettinghausen SE, Dalton RR, et al. Analysis of morbidity and mortality in 60 patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*. 1996;77:2622-9.
  100. Elias D, Antoun S, Raynard B, Puizillout JM, Sabourin JC, Ducreux M, et al. Traitement des carcinoses peritonelaes par exerese complete et

- chimiohypertermie intraperitoneale. Etude de phase I-II permettant de definir la meilleure procedure technique. *Chirurgie*. 1999;124:380-9.
101. Loggie BW, Fleming RA. Complications of heated intraperitoneal chemotherapy and strategies for prevention. *Cancer Treat Res*. 1996;82:221-33.
  102. Fujimoto S, Shrestha RD, Kokubun M, Kobayashi K, Kiuchi S, Ohta M, et al. Pharmacokinetic analyse of mitomicin C for intraperitoneal hypertermic perfusión inpatients with far-advanced or recurrent gastric cáncer. *Reg Cancer Treat*. 1989;2:198-202.
  103. Panteix G, Guillaumont M, Cherpín L, Cuichard J, Gilly FN, Carry PY, et al. Study of the pharmacokinetics of mitomicyn C in humans during intraperitoneal chemothermia with special mention of the concentration in local tissues. *Oncology*. 1993;50:366-70.
  104. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Slooten G, van Tinteren H, Boot, Zoetmulder FAN: Randomized trial of cytoreduction and hypertermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;12:3737-3743.
  105. Los G, Sminia P, Wondergem J, Mutsaers PH, Havemen J, ten Bokkel Huinink D, Smals O, Gonzalez-Gonzales D, McVie JG: Optimisation of intraperitoneal cisplatin therapy with regional hyperthermia en rats. *Eur J Cancer* 1991; 27:472-7.
  106. Pelz JO, Doerfer J, A Dimmler, Hohenberger W, Meyer T. Histological response of peritoneal carcinomatosis after hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) in experimental investigations. *BMC Cancer* 2006; 6:162.
  107. García Matus. Quimioterapia intraperitoneal: Técnica Quirúrgica. *Cancerología 3* (2008):125-130.
  108. Glockzin G, Hans J. Piso P. Peritoneal carcinomatosis: patients selection, perioperative complications and quality of life related to cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *World Journal Of Surgical Oncology* 2009, 7;5.
  109. Said H.M, Hubbe C.M, Rociano A.P, Ponce A, Barron E, y Gustavo Aquino C.G. Cirugía Citorreductiva (Peritonectomía) y Quimioterapia Intraperitoneal Hipertermica: En el tratamiento y prevención de la sarcomatosis peritoneal. *Cancerología 3* (2008):137-142.
  110. Tlahuel L.M, Rincón G.D, Said M.H, Francisco Javier Ochoa C.F. Cáncer epitelial de ovario; quimioterapia intraperitoneal. *Cancerología 3* (2006): 22-24.
  111. Pérez J, Rodríguez M.J, Campaña O, Veiras S, Lorenzo D, Lamas Álvarez M.J. Manejo Anestésico de 20 pacientes programados para peritonectomía y quimioterapia intraperitoneal caliente. *Rev. Esp. Anestesiología y Reanimación*. 2006; 53: 550-555.
  112. Alegre F.J et al. Carcinomatosis peritoneal: Quimioterapia intraperitoneal con hipertermia. *Oncología* 2004;27(4):262-264.

113. López- Berlanga J.L, De Miguel A, Elvira A.Experiencia en la anestesia y cuidados posoperatorios de 11 casos de peritonectomía y quimioterapia intraperitoneal caliente. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 2004;51:423-428.
114. Oñate Ocaña L.F, Crocifoglio V.A. Peritonectomia y Quimioterapia intraperitoneal Hipertermica (HIPEC) en pacientes con carcinomatosis por Carcinoma Gástrico. *Cancerología 3* (2008): 131-136.
115. Glehen O, Kwiatkowski F, Sugarbaker P.H, Levine E.A, et al. Cytoreductive Surgery Combined With Perioperative Intraperitoneal Chemoterapy for the Management of Peritoneal Carcinomatosis From Colonrectal Cancer: A Multi-Institutional Study. *Journal Of Clinical Oncology* 2004; 22(16): 3284-3292.
116. Peltz JO, Doerfer J, Hohenberg W, Meyer T: A new survival model for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in tumor-bearing rats in the treatment of peritoneal carcinomatosis. *BMC Cancer* 2005; 5;56.
117. Portilla AG, Cendoña I, De Tejada I.L, Olabarria I, Magrach L, et al. Revisión de Conjunto. Bases y Fundamentos del tratamiento de la carcinomatosis peritoneal por cáncer colorrectal. Revisión actual y puesta al día. *Cir Esp* 2005; 71 (1); 6-17.
118. Sugarbaker P.H. Peritonectomy procedures. *Ann Surg.* 1995. 221:29-42
119. Sugarbaker P.H. Overview of peritoneal Carcinomatosis. *WCI-Cancerología 3*( 2008): 119-124.
120. Zotano-Guerrero A, Urtasun AJ, Ariño PL, Saera MJ, Abad PL, Lorenzo PJ. Carcinomatosis peritoneal por tumor apendicular. *Oncología*, 2005; 28 (4): 197-201
121. Farina HG, Pomies M, Alonso DF, Gomez DE (October 2006). "Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer". *Oncol. Rep.* **16** (4): 885–91. PMID 16969510. [http://www.spandidos-publications.com/or/article.jsp?article\\_id=or\\_16\\_4\\_885](http://www.spandidos-publications.com/or/article.jsp?article_id=or_16_4_885).
122. Takaku T, Kimura Y, Okuda H (May 2001). "Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action". *J. Nutr.* **131** (5): 1409–13. PMID 11340091.
123. Kimura, Y; Kido, T; Takaku, T; Sumiyoshi, M; Baba, K (2004). "Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: its antitumor and antimetastatic actions". *Cancer Sci* **95** (9): 758–764. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03258.x. PMID 15471563.
124. Liu, Zhijun.; Schwimer, Joshua.; Liu, Dong.; Greenway, Frank L.; Anthony, Catherine T.; Woltering, Eugene A. Black Raspberry Extract and Fractions Contain Angiogenesis Inhibitors. *ACS Publications*.
125. Stanley G, Harvey K, Slivova V, Jiang J, Sliva D (April 2005). "*Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells". *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.* **330** (1): 46–52. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.116. PMID 15781230.
126. Kobayashi H, Matsunaga K, Oguchi Y. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*
  127. Lee JS, Park BC, Ko YJ, Choi MK, Choi HG, Yong CS, Lee JS, Kim JA. Grifola frondosa (maitake mushroom) water extract inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis through inhibition of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Journal of medicinal food*.
  128. Mushroom extract may stop breast cancer growth. *Reuters UK*. 15 April 2008.
  129. Green Tea Catechin, Epigallocatechin-3-Gallate (Egcg) Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Angiogenic Signaling by Disrupting the Formation of a Receptor Complex. *International Journal of Cancer*. 1 April 2006.
  130. Smith, Roderick. Antiangiogenic Substances in Blackberries, Licorice May Aid Cancer Prevention. *The Angiogenesis Foundation*. 6 May 2009.
  131. Wu L. W., Mayo L. D., Dunbar J. D., Kessler K. M., Baerwald M. R., Jaffe E. A., Wang D., Warren R. S., Donner D. B. (2000) Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 275: 5096-5103.
  132. Hamilton CA. Intraperitoneal bevacizumab for the palliation of malignant ascites in refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 111:530 (2008)
  133. Woolard J., Wang W. Y., Bevan H. S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R. O. Cui T. G., Sugiono M., Waive E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J. D., Whittles C. E., Mushens R. E., Gillatt D. A., Ziche M., Harper S. J., Bates D. O. (2004) VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*. 64: 7822-7835.
  134. Wiesmann C., Fuh G., Christinger H. W., Eigenbrot C., Wells J. A., de Vos A. M. (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*. 91: 695-704.
  135. Cecilia Carbone\*, Fabricio Maschi El ratón *nude (nu/nu)* como modelo animal de inmunodeficiencia.
  136. Scott E. Perkins, Neil S. Lipman. 1995. Characterization and Quantification of Microenvironmental Contaminants in Isolator Cages with a Variety of Contact Beddings. *Contemporary Topics*. Vol. 34. Nº 93 – 97.
  137. MacDonald, H.R., C. Blanc, R.K. Lees, and B. Sordat. 1986. Abnormal distri

138. Distribution of T-cell subsets in athymic mice. *J. Immunol.* 136:4337-4339.
- Hansen, C.T. 1978. The nude gene and its effects. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*,
139. J. Fogh and B. Giovanella, eds. New York: Academic Press. 1-35.
140. Fernando J. Benavides, Jean-Louis Guénet. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio, principios básicos y aplicaciones.* Universidad de Alcalá. SECAL. Laboratory Animals Ltd. 2003.
141. A. A. Tuffery. *Laboratory Animals, An introduction for experimenters.* Second edition. Wiley & Son.1995.
142. Michael F. W. Festing. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals.* Churchill Livingstone. 1976. 57 – 73.
143. Lela K. Riley. *Development of a Performance Assessment Program for Research Animal Diagnostic Laboratories and Defining Microbiologic Testing Standards.* Microbial Status and genetic Evaluation of Mice and Rats. 1999. 7 -13.

