



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Veterinaria

Hipertermia oncológica en pequeños animales

Oncological hyperthermia in small animals

Autor/es

Lluís Font Sala

Director/es

José Benito Rodríguez Gómez

Facultad de Veterinaria

2017-2018



ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Introducción a la hipertermia	3
2.2. Tecnología	4
2.3. Tipos de hipertermia	5
2.3.1. Hipertermia local	5
2.3.2. Hipertermia regional	6
2.3.3. Hipertermia a cuerpo completo	6
2.3.4. Perfusión hipertérmica	7
2.3.5. Técnicas emergentes	7
2.4. Efectos biológicos	7
2.5. Dosificación térmica	10
2.6. Medición de la temperatura	11
2.7. Riesgos	12
2.8. Sinergismo con otras terapias	13
2.8.1. Hipertermia y radioterapia	13
2.8.2. Hipertermia y quimioterapia	15
2.8.3. Hipertermia y cirugía	17
2.8.4. Hipertermia y nuevos enfoques	17
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1. Materiales	19
4.2. Métodos	19
4.2.1. Selección de los pacientes	20
4.2.2. Grupos experimentales y procedimientos	20
4.2.3. Seguimiento y evaluación	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1. Pacientes del grupo 1. Hipertermia local	22
5.2. Pacientes del grupo 2. Cirugía, quimioterapia e hipertermia regional	26
6. CONCLUSIONES	28
7. VALORACIÓN PERSONAL	29
8. BIBLIOGRAFÍA	30

1. RESUMEN

Cada día se llevan a cabo avances en la investigación contra el cáncer. Sin embargo, sigue siendo una de las causas de muerte más importantes en nuestra sociedad, tanto en animales de compañía como en humanos. La hipertermia en oncología se presenta como una alternativa al enfoque clásico utilizado en medicina actualmente. Esta terapia, consiste en elevar la temperatura del tejido tumoral por encima del rango fisiológico para conseguir efectos terapéuticos. Se puede aplicar de forma local, regional y a cuerpo completo. Tiene un efecto pleiotrópico frente al tejido tumoral y sus características promueven sinergismo al utilizarla junto a las terapias convencionales.

Este trabajo consta de una revisión bibliográfica actualizada sobre la hipertermia y su uso en veterinaria, respaldando el texto con la exposición de cuatro casos clínicos en los que se ha utilizado esta técnica en el tratamiento de cáncer en perros. Dos de ellos padecían tumores superficiales y han sido tratados con hipertermia local y los otros dos, con tumores en abdomen han sido tratados con una terapia multimodal compuesta por cirugía, quimioterapia e hipertermia regional. Los resultados obtenidos evidencian la viabilidad, seguridad y los potenciales beneficios que atesora esta terapia. Si bien es cierto que sigue precisando de investigación en ciertos ámbitos, parece tener las características adecuadas para integrarse en el tratamiento de cáncer en clínica veterinaria.

○ Abstract

Progresses are made every day in the fight against cancer. Yet it remains as one of the most important causes of death in our society both in humans and companion animals. Hyperthermia in oncology represents an alternative in the classic approach used in modern veterinary medicine. Its rationale consists in elevating tissue temperature above physiological range in order to attain therapeutic effects. It can be delivered locally, regionally or to the whole body. It has a pleiotropic effect against malignant cells and its characteristics promote synergism when used with conventional therapies.

This assignment includes an updated review of literature on hyperthermia and its use in veterinary medicine. Supported by the exposition of four clinical cases in which has been utilized in the treatment against canine tumours. Two of the patients suffered from superficial tumours and where treated with local hyperthermia and the other two had tumours deeply located in the abdomen and where treated with surgery, chemotherapy and regional hyperthermia. This study illustrates that hyperthermia is a feasible and safe technique and whilst further research is required it seems to have the appropriate characteristics to enter in the modern cancer treatment in veterinary medicine.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Introducción a la hipertermia

El cáncer es, actualmente, una enfermedad de importancia capital tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. No se conoce su prevalencia exacta, pero es una de las mayores causas de muerte en animales de edad avanzada (1). La mejoría en la calidad del tratamiento veterinario y la inversión creciente de capital en el cuidado de nuestras mascotas, ha originado un incremento notable de la esperanza de vida de nuestros animales y paralelamente de la prevalencia del cáncer (1). La emergencia de terapias alternativas es una realidad en el presente y la hipertermia es una de ellas.

La hipertermia es uno de los tratamientos más antiguos que existe contra el cáncer (2). Su uso se remonta aproximadamente 2000aC, en el antiguo Egipto, donde los papiros del médico *Edwin Smith* describían el tratamiento de cáncer de mama mediante cauterización. *Hipócrates*, el considerado “padre de la medicina” en la antigua Grecia reconocía el potencial del calor como herramienta para tratar tumores. Antiguos tratados de las medicinas China e India también mencionaban la hipertermia como modalidad terapéutica para esos fines (2). A finales del siglo XIX se descubrió que la fiebre causada al contraer erisipela podía tener efectos curativos sobre el cáncer. Sobre esa hipótesis, el científico *William Coley*, trató a casi 900 pacientes con cánceres inoperables induciéndoles fiebre a partir de la inyección de un extracto bacteriano. El 60% de los pacientes mostro regresión del cáncer y el 20% remisión permanente (3).

Alrededor de la década de los 80 se destapó un gran interés en la hipertermia. Estudios *in vitro* e *in vivo* revelaban el potencial citotóxico del calor frente a células tumorales y su capacidad de potenciar la quimioterapia y la radioterapia (4). Datan de esa época la mayoría de estudios realizados en medicina veterinaria (5). Sin embargo, su expansión se vio estancada a finales de siglo al aparecer estudios que no hallaban significación alguna en sus resultados (6). Más adelante, se ha constatado que muchos de ellos carecían de rigor científico y/o equipamiento adecuado (7). En los últimos años, progresos en la tecnología de los equipos, termometría, dosis térmica y en la comprensión del mecanismo de acción, han posibilitado tratamientos más seguros y eficaces reinstaurando el interés en esta terapia (8).

La hipertermia se define como la elevación de temperatura de un tejido corporal en el rango de 39-45°C. A temperaturas superiores se considera ablación termal (9). El tejido tumoral presenta una estructura anormal que le hace particularmente susceptible a los incrementos de temperatura (10). Elevando la temperatura hasta los 43°C, la hipertermia tiene un efecto

pleiotrópico que consigue dañar el tejido tumoral sin afectar al tejido sano (11). Por encima de este umbral, el calor posee un efecto citotóxico dosis-dependiente (12). Una de las mayores cualidades que presenta la hipertermia como terapia es la escasa incidencia de efectos adversos, pudiéndose utilizar en pacientes de riesgo (13).

Numerosos estudios clínicos han obtenido resultados significativos en términos de control local de la enfermedad, incidencia de recurrencias, supervivencia total y calidad de vida en diversos tipos de cáncer (10). Aunque puede que no sea necesariamente un tratamiento independiente, desempeña un papel sinérgico cuando se combina con radioterapia (14), quimioterapia (15), cirugía (10) e inmunoterapia (16), entre otras. La inmunoterapia es un tópico de actualidad en la investigación contra el cáncer y aguarda perspectivas de futuro prometedoras en este campo (17,18).

La hipertermia en medicina humana no está disponible de forma generalizada. Su uso se limita a centros especializados en países como Alemania, China, Estados Unidos, Japón y Holanda, entre otros. En medicina veterinaria su uso está aun menos extendido. Se utiliza en algunos centros especializados en radioterapia donde también poseen esta tecnología (*Animal Emergency & Specialty Center* en Knoxville, Estados Unidos) y en hospitales y universidades pioneras en investigación (*Center for Clinical Veterinary Medicine Ludwig-Maximilians-Universität München* en Múnich, Alemania).

Durante décadas, estudios utilizando esta terapia en perros, gatos y otros animales han servido de modelo para salud humana. El estudio de terapias alternativas en medicina veterinaria supone una gran oportunidad a la vez que una gran responsabilidad para los médicos veterinarios ya que ofrece una perspectiva muy valiosa (1). Actualmente, su atención en la hipertermia se centra en el desarrollo de nuevas técnicas y enfoques que permitan optimizar el tratamiento.

2.2. Tecnología

A lo largo de la historia de esta terapia, muchos han sido sus detractores. Distintos motivos, entre los cuales destacan la dificultad para alcanzar temperaturas terapéuticas en tejidos profundos, los problemas en la distribución de energía de forma homogénea en los tejidos y la medición de la temperatura con precisión, han supuesto un obstáculo constante en la expansión de esta técnica (9). Sin embargo, los progresos en los últimos 20 años son muy notables. Innovaciones tecnológicas en los equipos (19-21), evolución en la termometría (22), desarrollo de sistemas de software (23), implementación de planes de tratamiento (24), existencia de guías de aplicación de calidad (25-27), nuevos métodos (28) e irrupción de

técnicas innovadoras (29-31) han logrado disminuir poco a poco el impacto de estos obstáculos en el desenlace de los tratamientos.

Tradicionalmente, la hipertermia se basaba en métodos que utilizaban fuentes de calor a altas temperaturas para aumentar la temperatura tisular mediante la conducción (2). En la actualidad, las técnicas más comunes utilizan energía electromagnética (EM) (4). Los iones y moléculas de los tejidos, cargadas eléctricamente, interactúan con el campo EM originando fricción y colisiones dando lugar a energía calorífica. Este fenómeno es conocido como el efecto *Joule* (32). La regulación de este efecto, puede ser controlada minuciosamente con la cantidad de energía EM administrada según la frecuencia, la longitud de onda y la duración de la exposición (4). Radiofrecuencia (RF) a frecuencias entre 1MHz-100MHz y microondas (MW) a frecuencias entre 300-3000 MHz son las formas no ionizantes de radiación más utilizadas en el panorama médico. Ultrasonido (US), infrarrojo (IR) y laser son otras alternativas (10). Tamaño y profundidad del tumor son factores determinantes a la hora de escoger que frecuencia es la mas adecuada. En la práctica, existen equipos de distintos tipos entre los cuales distinguimos resistivos y capacitivos (33). Diversos estudios han comparado el efecto de ambos, tanto en tratamientos de hipertermia local (34) como en hipertermia regional (35). Los resistivos, utilizan frecuencias más altas con longitudes de onda más cortas, ofreciendo mejor distribución del calor en superficie y evitando la aparición de puntos calientes indeseados en el tejido graso. Los capacitivos utilizan frecuencias más bajas y longitudes de onda más largas logrando mayor penetración pero con tendencia a la dispersión del calor. Al mismo tiempo, poseen mayor propensión a la aparición de puntos calientes indeseados (33, 35).

2.3. Tipos de hipertermia

2.3.1. Hipertermia local

La hipertermia local es una técnica mediante la cual se incrementa la temperatura de una zona delimitada de dimensiones reducidas focalizando la EM lo máximo posible (36). Las temperaturas utilizadas varían en el rango de 39-45°C (9). Temperaturas superiores (>65°C) se utilizan con objetivos ablativos (37,38). Se suele utilizar sola o en combinación con radioterapia (4). Zonas axilar, inguinal, cervical, así como tumores con patrones irregulares y heterogéneos presentan dificultades para lograr una transmisión homogénea de energía (39). Existen multitud de equipos con diseños muy variados, pero en base general están constituidos por aplicadores externos, agujas endoluminales o agujas intersticiales que emiten RF, MW, US o laser (21,33). Los aplicadores externos se utilizan en tumores primarios superficiales y metástasis cutáneas (40,41). Las agujas endoluminales están indicadas para tratar tumores

instalados en cavidades huecas o espacios naturales del cuerpo como esófago, tráquea, útero o vejiga (42). Y las agujas intersticiales en tumores localizados en profundidad como en cerebro y cuello (43).

2.3.2. Hipertermia regional

La hipertermia regional (RHT) es una forma de hipertermia local en la que el objetivo es más amplio o tiene difícil acceso (36). Se utiliza sobretodo en tumores avanzados localizados en profundidad. Abdomen, tórax o pelvis son algunas de las localizaciones en las que está indicada (44). Se suele utilizar en combinación con quimioterapia, radioterapia y/o cirugía (4). Actúa posicionando aplicadores externos alrededor del órgano o zona que se desea tratar. Al abarcar mayores áreas, su aplicación es más compleja debido a la amplia variabilidad de propiedades físico-químicas de los tejidos (36). El calentamiento selectivo del tumor es posible debido a su pobre capacidad de termorregulación en comparación con el tejido sano (10). Requiere mayores recursos para monitorizar la temperatura y establecer un tratamiento adecuado (4). Avances en términos de optimización de la energía administrada están llevándose a cabo (29,30). Sin embargo, incrementar la temperatura de forma selectiva de tumores en profundidad sigue siendo uno de los mayores retos de la hipertermia en la actualidad (22).

En medicina veterinaria está cobrando protagonismo el uso la misma tecnología pero a temperaturas superiores con objetivos ablativos. El tratamiento de neoplasias avanzadas localizadas en profundidad en órganos como hígado, páncreas, pulmón o glándulas suprarrenales con esta técnica está obteniendo resultados prometedores (37,38).

2.3.3. Hipertermia a cuerpo completo

La hipertermia a cuerpo completo (WBH) es una técnica mediante la cual se incrementa la temperatura de todo el tejido corporal. Su uso se remonta a cuando el científico *William Coley*, mediante infecciones bacterianas, inducía fiebre a sus pacientes para tratar cáncer (17). Actualmente, no existe un estándar fijo para la temperatura en la WBH, pero el rango varía entre 39-41,5°C simulando el estado febril del cuerpo (16). A diferencia que en la hipertermia local se procura no rebasar los 41,8-42°C ya que por encima de ese umbral puede ocurrir daño irreversible en el tejido neurológico (45). Asimismo, por debajo de este, la temperatura puede ser mantenida durante largos períodos de tiempo (10). En la actualidad, existen diversos métodos utilizados para aumentar la temperatura de todo el cuerpo. El más extendido utiliza

radiación infrarroja (10). Su uso está indicado en tumores diseminados en uno o más órganos, en metástasis y en neoplasias que afectan a la médula ósea (4).

2.3.4. *Perfusión hipertérmica*

La perfusión hipertérmica es una técnica que consiste en elevar la temperatura del tejido deseado mediante la introducción de un fluido a mayor temperatura. Es una de las formas más antiguas de hipertermia (10). Se utiliza tanto como tratamiento único, como dentro de terapias multimodales junto con las terapias convencionales (16). Tiene numerosas indicaciones. Introduciendo fluidos en el sistema circulatorio para incrementar la temperatura de todo el cuerpo (46), de una zona determinada como pueden ser: extremidades (47), pelvis (48) o órganos concretos en casos de metástasis (49). E introduciendo fluidos en espacios como la cavidad torácica (50) o la cavidad peritoneal (51) después de una cirugía en la que no se consigue extirpar el tumor en su totalidad (cirugía cito-reductiva), para tratar tumores inoperables o cuando existen altas probabilidades de recurrencia. De hecho, la hipertermia en cavidad peritoneal (HIPEC) se encuentra en el foco de la investigación de la hipertermia siendo sujeto de la mayor parte de los estudios clínicos más recientes (52).

2.3.5. *Técnicas emergentes*

La investigación en la hipertermia en los últimos años y los progresos en tecnología biomédica han propiciado la irrupción de diversas técnicas que tienen como objetivo optimizar la deposición de energía en el tejido tumoral (8). Una de ellas es la electro-hipertermia modulada (mEHT) mediante la cual es posible incrementar la temperatura de las células tumorales de forma exclusiva (29). Utiliza ciertas diferencias bio-electromagnéticas entre las células sanas y las malignas para seleccionarlas pertinentemente (29). Su uso se está extendiendo en hospitales y clínicas en medicina humana y también ha demostrado su utilidad en oncología veterinaria (53). Otro campo de investigación emergente con resultados prometedores, utiliza diversos tipos de nanopartículas magnéticas (oro, hierro u orgánicas) para optimizar la deposición de energía sobre las células tumorales (54,30). Existen varias vías de investigación abiertas con el uso de la nanotecnología. Tanto como terapia única con fines inmunoterápicos (55) como en combinación con otras terapias (56,57).

2.4. EFECTOS BIOLÓGICOS

La energía electromagnética en forma de calor tiene un efecto directo sobre el tejido al cual se aplica (4). El tejido tumoral presenta una estructura anormal que le hace particularmente

susceptible a los incrementos de temperatura (10). Sus vasos sanguíneos son distintos a los del tejido sano; poseen estructura irregular, patrón circulatorio desordenado, capilares comprimidos, prolongados, contorsionados y con comportamiento expansivo, trombos, oclusiones, fistulas arteriovenosas, pared aberrante sin membrana basal elástica, alta resistencia al flujo sanguíneo, edema persistente, disminución en la excreción de metabolitos de desecho y facilidad de angiorrhexis. En condiciones de alta temperatura y presión, las terminaciones nerviosas anormales son incapaces de percibir con precisión la temperatura y transmitir la información al sistema nervioso central dando como resultado una termorregulación deficiente (10). Dichas características explican que un aumento de temperatura determinado (39-43°C) ocasione daño al tejido tumoral logrando dejar intacto el tejido sano (4). A temperaturas superiores se ve afectado por igual el tejido sano. Los umbrales de daño a los distintos tipos de tejido corporal se encuentran descritos en la literatura (58). Mediante la circulación periférica y la sudoración el cuerpo humano es capaz, dentro de unos límites, de termorregular eficientemente cuando es sometido a un estímulo calorífico focalizado. Sucede de distinta forma en la fisiología de la termorregulación animal. Esto, puede ser un factor favorable en el tratamiento de animales por la incapacidad de dispersar la temperatura con la misma eficiencia. Al mismo tiempo, puede convertirse en un inconveniente impidiendo que el animal tolere las temperaturas terapéuticas. Estas diferencias se corresponden a la experiencia *in vitro* que demuestra la menor resistencia térmica de las células animales respecto a las células humanas (12).

En 2011 *Hanahan y Weinberg* (59) publican un artículo en el que revisan los que creen ser los principios fundamentales del cáncer y los puntos en que investigaciones futuras deben incidir. Cuatro años más tarde *Issels et al.* (11) responden poniendo de manifiesto la relación entre dichos principios y los efectos terapéuticos de la hipertermia.

La hipertermia tiene un efecto pleiotrópico que detiene el crecimiento tumoral y su progresión (11). Por un lado, a temperaturas por encima de los 43°C existe un efecto citotóxico directo dosis dependiente (tiempo-temperatura) (58). Este efecto se debe, en gran parte, a la liberación de radicales libres (60). La hipertermia produce estrés oxidativo que origina la liberación de especies de oxígeno reactivo (EOR). Multitud de reacciones se desencadenan desnaturalizando proteínas, oxidando lípidos, polisacáridos y deteriorando el ADN de la célula (7,60). Componentes del núcleo, membrana, citoplasma y mitocondria en particular (60,61) se desestabilizan dando lugar a la inducción de apoptosis y posterior necrosis (7).

Por otro lado, a temperaturas a partir de los 38-39°C la hipertermia produce multitud de cambios que desencadenan la progresión del daño y la sensibilización del tejido al tratamiento

con otras terapias (11). Esta característica le confiere múltiples aproximaciones en tratamientos en fase de prueba en el presente y futuro próximo. Los mecanismos más destacados se detallan a continuación.

- Cambios en el microambiente tumoral y la microcirculación

El aumento de temperatura provoca estrés metabólico dando lugar a una serie de reacciones en cadena. La estructura anormal del tejido con perfusión pobre, resistencia al flujo sanguíneo y niveles de O₂ bajos le impiden satisfacer su requerimiento de energía dando como resultado el inicio de la glicólisis anaeróbica (10). El acumulo de ácido láctico disminuye el pH del medio y en estas condiciones aumenta la sensibilidad al efecto citotóxico del calor (62).

La hipoxia persistente es un factor determinante en el estado de inmunosupresión del microambiente tumoral y en la progresión del cáncer (63). Estudios muestran que el aumento de temperatura induce la regulación de *Hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) (64,65). Lo cual se traduce en vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo y drenaje de metabolitos de desecho dando como resultado reperusión y reoxigenación del tejido tumoral (66,67). Fenómeno demostrado en un estudio realizado por *Thrall et al.* (68) en sarcomas en caninos.

Bajo los efectos de la hipertermia la microcirculación tumoral se ve alterada ocasionando extravasación de fluidos, tumefacción, destrucción de membranas y embolismo capilar. Todo ello, provoca un deterioro en la angiogénesis tumoral y su propagación (10). *Roca et al.* (69) y *Kaur P.* (70), entre otros, describen en detalle los mecanismos que regulan este proceso. Sin embargo, existe controversia en este campo ya que algunos investigadores muestran una promoción de la angiogénesis mediante la regulación del mismo *HIF-1* (64).

- Efecto sobre el ADN

A temperaturas por encima de los 46°C el calor, al igual que la radiación ionizante, tiene efectos directos sobre el ADN desnaturalizando proteínas nucleares y produciendo roturas en las dobles hélices de ADN (7). Sin embargo, se cree que no ocurre lo mismo a las temperaturas utilizadas durante la hipertermia. En el rango de 40-46°C se produce desplegamiento y agregación de proteínas alterando múltiples componentes de la célula (7). Funciones de la membrana celular, mitocondrias y matriz nuclear se ven afectadas (7,60,61). Todo ello repercute de forma crítica en las funciones del ADN. Segregación de los cromosomas, reparación, replicación y transcripción se ven directamente deteriorada (7,71,72). La singularidad de que la hipertermia evite la reparación del ADN resulta de particular interés

cuando se utiliza con otras terapias. Daño sub-letal producido en las células tumorales por la radioterapia o quimioterapia puede convertirse en letal al adjuntar la hipertermia (58).

○ Efecto sobre el sistema inmunitario

El estado de inmunosupresión en el tejido tumoral es uno de los principios determinantes de la progresión del cáncer, detallados por *Hanahan y Weinberg* en 2011 (59). La hipertermia con su efecto pleiotrópico regula multitud de series celulares que intervienen en la respuesta inmunitaria (11). Tiene efectos tanto sobre la inmunidad innata como sobre la específica antitumoral (17). Revisiones realizadas por *Toraya et al.* (17), *Repasky et al.* (73) y un capítulo del libro escrito por *Kokura et al.* (16) desarrollan al detalle los distintos mecanismos que rigen este efecto. A continuación se resumen los aspectos más relevantes. La hipertermia incrementa la expresión de receptores inmunógenos de membrana (MICA y MHC-I) estimulando la función de células *natural killer* (NK) (74) y promoviendo la infiltración de linfocitos T a linfonodos, placas de peyer y microambiente tumoral (comúnmente conocido como *lymphocyte trafficking*) (75). Este fenómeno, se ve facilitado su vez, por el aumento de la permeabilidad y la perfusión tumoral (67). La hipertermia promueve la acción de macrófagos y la maduración de células dendríticas en las células tumorales (76). Estimula la liberación de exosomas actuando como antígenos tumorales (77). Y, por último, promueve la expresión de la proteína de choque térmico *HSP70* (78). Las proteínas de choque térmico (HSP) son un amplio grupo de proteínas pertenecientes a la familia de las chaperonas. Se liberan en situaciones de estrés celular a modo de supervivencia (79,80). La expresión de HSP puede inducir a termotolerancia (58), entendida como resistencia a posterior quimioterapia, radiación ionizante o sucesivos tratamientos con hipertermia (58). Sin embargo, este efecto desaparece con el tiempo y es fácilmente evitable con adecuados protocolos de tratamiento (10). En el caso concreto de *HSP70* aparece en superficie celular actuando como antígeno de superficie y desencadenando la acción de la inmunidad específica antitumoral (78).

2.5. Dosificación térmica

La absorción de energía electromagnética (EM) por un tejido se cuantifica mediante el valor SAR (*specific absorption rate*) expresado en W/Kg (81). La conductividad eléctrica de cada tejido y su distribución espacial en el cuerpo va a influir directamente este valor. Durante el tratamiento con hipertermia, el tejido no está aislado térmicamente y pierde energía por conducción hacia el tejido circundante (4). Además, la heterogeneidad de los distintos tejidos dificulta una distribución homogénea de la temperatura (82). Esfuerzos para resolver esta

cuestión se están llevando a cabo con el desarrollo de técnicas que permitan concentrar la energía administrada de forma eficiente (8,55).

De la necesidad de administrar una dosis térmica concreta y poder unificar diferentes medidas de tiempo y temperatura surgió el concepto *Thermal isoeffect dose* (TID). Mediante una ecuación matemática se convierten determinados valores de tiempo y temperatura en minutos equivalentes acumulados a 43°C (CEM 43°C) (12). Por otro lado, se creó un sistema utilizando percentiles para determinar la distribución espacial de temperatura. Escogiendo T90, T50 y T10 como parámetros a utilizar. Entendiéndose T90 como la temperatura que exceden el 90% de los valores medidos en el tejido tratado. Análogamente para T50, y T10 (83). De la unión de estos dos conceptos surge el parámetro dosimétrico CEM43°C T90. Su uso sigue vigente hoy en día (25) aunque ha sido cuestionado por diversos investigadores (84). Estudios en humanos en los que se ha utilizado este parámetro, respaldan la existencia de una relación dosis-efecto en el tratamiento (85). *Thrall et al.* (86) en un estudio randomizado en perros con sarcomas de tejidos blandos, puso en evidencia las ventajas de prescribir una dosis establecida de CEM43°C T90 en términos de control local de la enfermedad. En una revisión reciente *Van rhoon et al.* (82) considera que, aunque posea debilidades, este sigue siendo un método útil de dosificación térmica. No obstante, este método está fundamentado en la citotoxicidad del calor (58). Por esa razón, la nueva tendencia hacia la hipertermia moderada que utiliza temperaturas inferiores (<43°C) con objetivos relacionados con la potenciación de la inmunidad y la modificación del microambiente tumoral, hace pensar que este campo sufrirá innovaciones en el futuro próximo (8). De hecho, siguiendo las indicaciones de la *European society of hyperthermic oncology* (ESHO), las guías de aplicación de tratamientos de calidad en salud humana más recientes (27) ya emplean nuevos criterios. Los cuales están fundamentados en el incremento de temperatura (TR), el área con temperatura efectiva (TEFS) y la penetración con temperatura efectiva (TEPD) como parámetros a utilizar para conseguir un tratamiento de hipertermia con garantía de fiabilidad.

2.6. Medición de la temperatura

La administración de un tratamiento térmico de calidad, entendido como calentamiento homogéneo del tejido tumoral de forma selectiva, es el mayor reto al que se enfrenta la hipertermia actualmente. El manejo adecuado de la temperatura es crucial en ese aspecto (9). Tradicionalmente el control la temperatura se ha realizado mediante termometría invasiva. Utilizando sensores intratumorales o endoluminales posicionados de forma estratégica (10). Siempre de evitar interferencias con el campo electromagnético (33). La inserción de estos

dispositivos implica riesgos como la aparición de puntos de concentración de calor indeseados, dolor, inflamación o la formación de abscesos (10,87). Por ello, el futuro reside en la termometría no invasiva (22). Varios métodos han sido propuestos. Con la termometría por resonancia magnética (IRM) se han obtenido los mejores resultados (10, 22). Gracias a ella, es posible percibir información tridimensional de la distribución de la temperatura en el tejido tratado de forma precisa. Además, mediante *software* especializado, modular el tratamiento a tiempo real según se requiera (22,88). Actualmente este es el método recomendado ya que presenta grandes ventajas respecto al resto (22). Desafortunadamente su elevado coste lo convierte en inaccesible para muchos.

2.7. Riesgos

La diversidad en la estructura físico-química de los tejidos puede dar lugar a variaciones en la temperatura en un mismo volumen de tejido tratado. Consecuentemente, en ocasiones, pueden desencadenarse efectos opuestos de forma simultánea (82).

Distintas guías con límites recomendados de exposición a energía electromagnética (EM) en humanos, han sido diseñadas. Destaca la elaborada por la Comisión Internacional de Protección ante Radiación No Ionizante (ICNIRP) (89). Existe extensa literatura sobre los efectos a la exposición del cuerpo a EM (90). Hasta el momento, no se han obtenido pruebas fehacientes de que la exposición por debajo de los límites estipulados suponga riesgo alguno para la salud (91). Sin embargo, durante prácticas médicas, ocurren exposiciones a valores por encima de estos límites (92). Esto no implica riesgo necesariamente. *Foster et al.* (93) reflexiona sobre el extremo conservadurismo de los límites propuestos por ICNIRP. En un estudio reciente realizado por *Adibzadeh et al.* (94) se constata, que el margen de seguridad para tejido muscular respecto a los límites actuales puede ser de un factor de hasta 31,2.

Existen límites de exposición térmica según valores en CEM 43^aC para los distintos tipos de tejido (58,95). La toxicidad asociada a la hipertermia es generalmente baja (9). Uno de los puntos fuertes de esta técnica es la baja incidencia de efectos adversos asociados cuando lo comparamos con otras terapias actualmente utilizadas (13). Las quemaduras se encuentran entre los más típicos (9) aunque pueden evitarse, en la mayoría de las ocasiones, con el uso de buenas prácticas de aplicación (25-27). Cabe destacar que el umbral de temperatura para el dolor es muy inferior al umbral para daño físico (58).

Tanto en el humano como en las especies canina y felina, el tejido nervioso, parece ser el más sensible a los incrementos de temperatura (58). Estudios demuestran daño irreversible en el

tejido nervioso al sobrepasar 42,5°C durante períodos prolongados de tiempo (45). Por debajo de este umbral, *Takahashi et al.* (96) en un estudio en perros utilizando WBH, no halla síntomas neurológicos ni daños a nivel microscópico de ningún tipo, en el sistema nervioso central. Otras consideraciones en aparatos y órganos concretos o sobre el desarrollo están descritas en la literatura (91,97). La posibilidad de que la hipertermia fomente la carcinogénesis ha sido estudiada. A diferencia de agentes químicos utilizados en quimioterapia o la radiación ionizante en radioterapia, parece no promover este efecto (15). Sin embargo, se ha observado que sí posee la capacidad de modular el potencial carcinogénico de quimioterápicos y radiación ionizante al utilizarlos conjuntamente (98). A día de hoy, la mayoría de estudios que se han cuestionado si la exposición a radiofrecuencia promueve la carcinogénesis no han obtenido resultados significativos (91). Sin embargo, estudios que determinan lo opuesto (99,100), demuestran que se precisa de ulterior investigación en este campo. Con especial atención a las exposiciones crónicas a RF.

2.8.SINERGISMO CON OTRAS TERAPIAS

2.8.1. Hipertermia y radioterapia

La radiosensibilización se define como la mejora de la eficacia de la radioterapia al aplicarla junto a la hipertermia (92). El grado de sinergismo, va a depender de factores como la temperatura, el intervalo de tiempo entre calor y radiación, y la secuencia del tratamiento. Existe distendida experiencia clínica, tanto en humanos como en animales, que avalan el uso de estas dos modalidades de forma conjunta en determinados tipos de cáncer (40,101-103). Sin embargo, es una realidad que siguen existiendo incógnitas sobre la base fisiológica de esta sinergia (9). Una detallada revisión realizada por *Kaur P.* (70) razona los mecanismos que fundamentan esta combinación. A continuación se destacan aquellos mas relevantes.

La acción citotóxica del calor afecta al grupo de células con mayor resistencia a la radioterapia (70). Hipoxia, pH bajo y déficit de nutrientes son aquellas características que dotan al tumor de radioresistencia. Algo similar sucede con la fase celular. Las células en fase S parecen ser aquellas más radioresistentes (4) siendo al mismo tiempo el principal grupo de células afectadas por la hipertermia (7). Esto ayudaría a explicar que tumores con pronóstico generalmente reservado utilizando radioterapia, obtengan notables beneficios al adjuntar la hipertermia. No obstante, la acción citotóxica sobre las células tumorales no explica, por si sola, la diferencia significativa en el desenlace de los tratamientos a los que se adjunta hipertermia (70). Otros mecanismos entran en escena.

El estado de hipoxia es el factor número uno causante de radioresistencia (4). Tal y como se ha descrito anteriormente (*ver apartado 2.4*) la hipertermia a temperaturas entre 39-43°C aumenta el flujo sanguíneo dando como resultado la reperfusión y reoxigenación del tejido tumoral. En la práctica, tumores previamente irradiados con oxigenación limitada pueden volverse de nuevo sensibles al ser tratados con hipertermia (40).

La hipertermia, a diferencia de la radiación ionizante no provoca daño directo sobre el ADN (7). Sin embargo, mediante efectos sobre proteínas involucradas en la replicación del ADN, segregación de los cromosomas y la reparación del ADN, desencadena la progresión del daño incrementando la susceptibilidad de la célula frente a la radiación ionizante (70). La radioterapia, al igual que la quimioterapia afecta tanto al tejido tumoral como al tejido sano. No son pocas las veces en el que efectos adversos generan un impacto severo en la salud del paciente (104). La hipertermia, con su efecto pleitrópico, tiene la capacidad de potenciar la inmunidad a distintos niveles (*ver apartado 2.4*). En la práctica, resulta de utilidad en cuerpos preirradiados que no toleran con la misma eficiencia sucesivas sesiones de radioterapia (40).

Existe amplia experiencia clínica en el uso de radioterapia junto a hipertermia. Carcinoma mamario (105), melanoma metastático (41), tumores en cerebro y cuello (106), neoplasias en pelvis (107), sarcoma de tejidos blandos (108) o cáncer de pulmón de células no pequeñas (109) se encuentran entre los tumores que han sido sometidos a evaluación en estudios randomizados en humanos.

En medicina veterinaria, desde la década de los 70 hasta hoy, se han realizado numerosos estudios clínicos como modelo para la salud humana. Siendo el objetivo principal la puesta a prueba de la eficacia y seguridad del tratamiento combinado *in vivo*. La mayoría de ellos datan de finales del siglo XX. *Page et. al.* (104) diseñó una guía de aplicación para hipertermia y radioterapia en perros y gatos. Entre las neoplasias en los que se han observado beneficios al utilizar radioterapia junto a hipertermia se encuentran: carcinoma oral (110), sarcoma de tejidos blandos (111,112), fibrosarcoma (113), melanoma metastático (114), mastocitoma (115), linfomasarcoma (116), carcinoma de células escamosas (117) y hemangiopericitoma (118), entre otros. Beneficios en términos de control local quedan demostrados en estos estudios. Al mismo tiempo, resultados obtenidos en algunos de ellos evidencian la necesidad de ulterior investigación respecto a la duración de las respuestas (111). Otras investigaciones no observan significación alguna en sus resultados (119). Por otro lado, algunos de ellos describen un incremento en la incidencia de los efectos adversos asociados a la radioterapia (112). Más adelante, se ha demostrado que dichos efectos se pueden reducir al mínimo con el uso de

buenas prácticas y equipamiento adecuado (16). Queda en evidencia, que la mayor parte de experiencia clínica documentada existente en medicina Veterinaria carece de actualización.

Estudios más recientes, amparan el uso de radioterapia e hipertermia dentro de nuevas estrategias para combatir el cáncer (57). Sin embargo, en la actualidad, su uso en veterinaria se limita a un número reducido de centros, localizados principalmente en Estados Unidos, Japón y Alemania.

2.8.2. Hipertermia y quimioterapia

La quimiosensibilización se define como la mejora de la eficacia de la quimioterapia al administrarla junto a hipertermia (92). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el efecto citotóxico de algunos fármacos se ve incrementado con la hipertermia (16). Se entiende como (*Thermal enhancement ratio -TER*) al cociente entre la supervivencia celular a elevada temperatura y la supervivencia celular a temperatura normal a una concentración de fármaco determinada (92). Podemos clasificar los efectos producidos por la hipertermia en: aditivo, superaditivo, complejo e independiente (15). Ejemplos de fármacos utilizados hoy en día en clínica veterinaria son el cisplatino o la ciclofosfamida, en los cuales existe una relación lineal entre la temperatura y la citotoxicidad a partir de 37°C. En otros, como la vincristina, el efecto citotóxico es independiente al calor (15). No obstante, esto no significa que *in vivo* no exista una mejora en el efecto terapéutico ya que existe toxicidad independiente de las dos terapias y diversos mecanismos dan lugar a cooperación espacial entre ellas (15). Los más relevantes se detallan a continuación. En primer lugar, el aumento de temperatura provoca vasodilatación, incremento del flujo sanguíneo, perfusión tumoral, permeabilidad celular y reducción de la presión intersticial lo que facilita la penetración del quimioterápico en el tejido tratado (67). La microcirculación tumoral aberrante da lugar a estasis sanguíneo potenciando aun mas este efecto (82). Actualmente sucede a menudo en la quimioterapia sistémica que las cantidades de fármaco que llegan al tumor son desconocidas, pudiendo hasta ser menores de un 1% del total (120). Mediante el tratamiento con hipertermia, se consiguen concentraciones superiores en el tejido tratado (121). A efectos prácticos, este fenómeno se traduce en la posibilidad de reducir la dosis del fármaco y consecuentemente los efectos adversos (10). Otro factor que favorece la resistencia a la quimioterapia y radioterapia son las áreas hipoxicas (65). La reoxigenación del tejido actúa deteriorando dicha resistencia (67). Por último, de la misma forma que sucede en la combinación con radioterapia, el efecto dañino sobre la función de reparación del ADN repercute directamente en la progresión del daño (15).

Estudios recientes han demostrado que la hipertermia puede prevenir la resistencia y hasta recobrar la sensibilización a la quimioterapia (122). Se ha comprobado que el tratamiento puede llevarse a cabo de forma segura sin incrementar la incidencia de efectos adversos (123). Otro punto a tener en consideración es la reducción del riesgo que supone adjuntar hipertermia a la quimioterapia (15). Contrariamente a lo que se creía (124), esta combinación podría tener menos potencial carcinogénico que el fármaco por si solo (15). Esta instancia podría estar explicada por la mayor susceptibilidad a mutaciones de las células en fase S (125), que su vez, son el grupo de células más afectadas por la hipertermia (7).

Existen numerosos estudios clínicos de notable envergadura con resultados significativos utilizando quimioterapia e hipertermia en determinados tipos de cáncer (122, 126-130). Un estudio randomizado fase III de gran magnitud, llevado a cabo de forma conjunta por la ESHO y la EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) en sarcomas de tejidos blandos, ha obtenido resultados significativos tanto en términos de tiempo sin enfermedad, como en supervivencia total del paciente (131). Otro estudio de características similares no comparte dichos resultados (132).

Al igual que sucede en la radioterapia, alrededor de la década de los 80 se realizaron numerosos estudios en medicina veterinaria para poner a prueba la eficacia y seguridad *in vivo* de la hipertermia junto a la quimioterapia. *Marmor et al.* (133) describe la interacción de fármacos bajo los efectos de la hipertermia en modelos animales. Otros estudios evalúan el comportamiento farmacocinético de quimioterápicos concretos (124). *Théon et al.* (134) utiliza cisplatino intra-tumoral con posterior hipertermia local en animales con tumores superficiales, evidenciando la viabilidad de este enfoque de tratamiento. Un estudio randomizado en perros con linfoma revela un incremento del tiempo libre de enfermedad en el grupo de animales tratado con quimioterapia y WBH (135). Otro estudio con características similares no encuentra significación alguna en sus resultados (136). En la actualidad, un campo de investigación con expectativas prometedoras es el del uso de microtransportadores con el objetivo de depositar el quimioterápico en el tejido tumoral de forma selectiva. Estudios en gatos (137), perros (138) y conejos (139) en los que se utiliza doxorubicina encapsulada en liposomas termosensibles para tratar diversos tumores, constatan la seguridad y viabilidad de esta técnica.

2.8.3. Hipertermia y cirugía

La cirugía, junto con la radioterapia y a la quimioterapia, es uno de los pilares de la terapia multimodal actual utilizada contra el cáncer (1). Utilizarla junto a hipertermia puede resultar útil tanto en preoperatorio, intra-operatorio o post operatorio (10). Revertir la condición de inoperable, disminuir el riesgo de recurrencia tras cirugía o tratar tumores en los que no es posible la escisión completa, son los principales objetivos perseguidos al adjuntar la hipertermia (10,44). Gran parte de los estudios más recientes y aquellos teniendo lugar actualmente (52), centran su atención en un enfoque de tratamiento compuesto por cirugía, hipertermia, quimioterapia y/o radioterapia (127,128,132,140,141).

2.8.4. Hipertermia y otras terapias

En los últimos años, la inmunoterapia es uno de los campos en los que más capital se está invirtiendo en investigación contra el cáncer. Estudios recientes demuestran su utilidad en el tratamiento del cáncer (142) y es cuestión de tiempo para que se expanda globalmente. La inmunoterapia basa su acción en la capacidad que tiene el propio sistema inmunitario del paciente para combatir la enfermedad. La hipertermia, en sí misma es una forma de inmunoterapia (17,55,73). Como se ha desarrollado previamente (*apartado 2.4*), la elevación de la temperatura corporal por encima de 39°C desencadena un conjunto de mecanismos que dan como resultado un incremento en la inmunidad innata y específica antitumoral (17). Una hipótesis presente en panorama médico concibe que en el organismo existen determinados puntos de control extremadamente sensibles para el sistema inmune, regulados por el calor, que han sido preservados durante la evolución. La hipertermia podría constituir una herramienta útil para obtener efectos terapéuticos a través de ellos (73).

Recientemente, se ha utilizado la hipertermia junto a otras formas de inmunoterapia para así lograr un efecto sinérgico estimulando la inmunidad del individuo. *Kokura et al.* (16) dedica 4 capítulos de su libro en los que detalla las distintas opciones utilizando inmunoterapia e hipertermia de forma conjunta. Terapias junto con células dendríticas, células NK, células T (activadas o vírgenes) o factor de necrosis tumoral (TNF) son algunas de las técnicas bajo investigación en las que se han observado resultados favorables (16,143). Recientemente, un estudio en sarcomas caninos utiliza partículas semi-virales junto a hipertermia y radioterapia constatando la viabilidad y potencial beneficio de esta opción de tratamiento (57).

La inmunoterapia está íntimamente relacionada con otra terapia emergente llamada terapia génica. La terapia génica fundamenta su acción en la regulación de la expresión de

determinados genes con el objetivo de impedir la progresión del cáncer. A su vez, la hipertermia es una forma de terapia génica ya que posee la capacidad de regular la expresión de determinados genes implicados en la inmunidad específica antitumoral (144). *Chi et al.* (145) en un estudio sarcomas caninos certifica diferencias en la expresión génica en relación con la respuesta terapéutica. Destaca correlación significativa con genes relacionados con la reparación del ADN, inflamación, señalamiento de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) y telomerasa.

Utilizando hipertermia junto a terapia génica se ha logrado modular la expresión de determinados genes en el tejido tumoral preservando el tejido sano y manteniendo la inmunidad del individuo. *Sidduqui et al.* (146) en un estudio fase I en gatos con sarcomas de tejidos blandos constata que es factible lograr expresión localizada de genes antitumorales.

En libro escrito por *Clifford et al.* (10), se describe también el uso de la hipertermia junto a otras terapias como la Vitamina C o la medicina tradicional China (TCM), entre otras.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de fin de grado es principalmente elaborar una revisión bibliográfica actualizada sobre la hipertermia como terapia en oncología e indagar sobre el uso que tiene en medicina veterinaria. La mayoría de los estudios clínicos en perros y gatos datan de la década de los noventa en los que se utilizaban como modelo para medicina humana. A día de hoy, el interés en esta terapia ha resurgido gracias a los resultados obtenidos en grandes estudios randomizados en humanos. Sin embargo, los centros veterinarios que disponen de esta tecnología son escasos y su aceptación pasa por la realización de estudios clínicos de calidad en distintos tipos de tumores.

Este trabajo secunda el marco teórico con una puesta en práctica de la terapia en cuatro casos clínicos. Con el objetivo principal de evaluar si es una técnica segura y aplicable en la clínica veterinaria. Al mismo tiempo, pudiendo observar su efecto en algunos tipos de tumores.

Con todo ello se ilustra si la hipertermia, ya sea como terapia única o integrada en tratamientos multimodales, puede tener cabida dentro del estándar actual de tratamiento del cáncer en perros y gatos.

4. METODOLOGÍA

4.1. MATERIALES

El equipo de hipertermia utilizado fue un sistema capacitivo que actuaba a 1MHz de frecuencia y 240W de intensidad máxima (*TecarVet 50 Basic*) (*fig. 1*). El medio conductor entre equipo y paciente consistió en crema conductora.

La ESHO define como adecuado a un equipo de hipertermia para fines oncológicos cuando es capaz de incrementar la temperatura 6°C en 6 minutos a 1 cm de profundidad en un modelo de tejido muscular (27). Sin recursos disponibles para confeccionar un modelo muscular, el equipo fue evaluado en tejido muscular canino durante un examen post-mortem verificando que dicho incremento de temperatura era realizable.

Para la medición de los tumores en los casos pertinentes se utilizó un calibre *Vernier* con documentación fotográfica anexa. Para la monitorización de la temperatura se dispuso de un termómetro infrarrojo digital sin contacto.



Figura 1. Equipo de Hipertermia (*TecarVet Basic 50*) con los componentes utilizados

4.2. MÉTODOS

Este estudio, consta de un informe de 4 casos en los que se utilizó la hipertermia en el tratamiento de tumores. En dos de ellos se utilizó hipertermia local como terapia única para tratar tumores en superficie (grupo 1) y en otros dos se utilizó hipertermia regional junto a quimioterapia, después de la extirpación quirúrgica del tumor, para tratar tumores en abdomen (grupo 2). Los cuatro pacientes seleccionados eran perros con dueño particular. En

todos los casos se habían agotado las opciones terapéuticas convencionales o bien el propietario no disponía de recursos económicos para someterle a ellas. Un documento informativo fue firmado por ambas partes certificando el consentimiento.

4.2.1. Selección de los pacientes

El criterio de inclusión al estudio de los pacientes eran tumores recidivantes y/o inoperables en el caso de los pacientes del grupo 1 o tumores con altas probabilidades de recurrencia en el grupo 2. El diagnóstico histológico mediante biopsia de todos los tumores fue considerado obligatorio. Perros con patologías avanzadas que pudieran interferir en el transcurso del tratamiento fueron excluidos (cardiopatías graves, enfermedad renal crónica y desordenes endocrinos, entre otros).

4.2.2. Grupos experimentales y procedimientos

- *Grupo 1. Hipertermia local*

El primer grupo estaba formado por una perra, mestizo de 16 años con 2 nódulos mamarios (paciente nº 1). Uno localizado en M3 izquierda de 2,4cm y otro en M5 izquierda de 0,3cm. El de mayor tamaño fue designado como lesión diana del tratamiento. Fue biopsiado y diagnosticado histológicamente como carcinoma mamario. Al inicio del tratamiento midió 1,4cm. El estadiaje del cáncer de mama dio como resultado “estadio I” (1). Entre sus antecedentes clínicos constaban insuficiencia cardíaca leve y dermatitis atópica.

El otro perro integrante del grupo era un macho, mestizo de 12 años de edad con un masa perianal parcialmente ulcerada de 8,5x5,15cm (paciente nº 2). La masa había sido extirpada quirúrgicamente un mes antes y había recidivado. Fue diagnosticada histológicamente como carcinoma de células escamosas y designada como lesión diana del tratamiento. Entre sus antecedentes clínicos constaban erlichiosis y bronquitis crónica.

El protocolo de tratamiento consistió en 10 sesiones de 10 minutos de hipertermia local a 43°C. Dedicando antes 5 minutos para alcanzar la temperatura de forma progresiva (*graf. 2*). Si la temperatura excedía el límite establecido la potencia se reducía, por lo que períodos cortos a temperaturas superiores pudieron ocurrir. Las sesiones deberían estar separadas como mínimo por 3 días para evitar termotolerancia.

La dosis térmica prescrita por sesión fue de 10 CEM 43°C. No se tomaron consideraciones espaciales al disponer únicamente de una medición de temperatura. Otros parámetros registrados fueron la temperatura media (T_{ave}), temperatura máxima (T_{max}) y temperatura mínima (T_{min}).

- **Grupo 2. Cirugía, quimioterapia e hipertermia regional**

El segundo grupo estaba formado por un Bóxer hembra de 10 años con un hemangiosarcoma esplénico fragmentado (estadio II(1)) (paciente nº 3). Y un *Cocker Spaniel* hembra de 10 años con un linfoma intestinal localizado (paciente nº 4). Ambos diagnosticados histológicamente.

El protocolo de tratamiento consistió en la escisión quirúrgica del tumor, 5 ciclos de quimioterapia en el plazo de 15 semanas post-cirugía e hipertermia regional (RHT) en la zona abdominal, administrada justo antes de cada ciclo de quimioterapia. El fármaco de elección fue la doxorubicina (30mg/m²) de acuerdo con las guías oncológicas AAHA para perros y gatos (147). En este protocolo no se utilizó el parámetro CEM 43°C para determinar la dosis puesto que la finalidad del tratamiento eran principalmente los efectos indirectos sobre el tejido y potenciadores de la quimioterapia a <43°C. El objetivo fue mantener la temperatura de la zona abdominal en el rango de 41-43°C durante 30 minutos. Dedicando antes 5 minutos para alcanzar la temperatura de forma progresiva. Se registraron los valores de temperatura media (T_{ave}), temperatura máxima (T_{max}) y temperatura mínima (T_{min}).

4.2.3. Seguimiento y evaluación de los pacientes

Durante el transcurso del tratamiento se estableció un protocolo de control de los pacientes. Hemograma, perfil bioquímico y urianálisis fueron realizados a cada paciente previo al inicio del tratamiento para certificar su aptitud. Un protocolo de sedación basado en la combinación de alfaxalona y metadona intramuscular fue diseñado para emplearlo en caso de ser requerido. Exámenes físicos generales fueron programados antes de cada sesión. Monitorización de la temperatura corporal, frecuencia cardíaca, oxigenación y presión arterial se establecieron durante el transcurso de cada sesión. La medición de la temperatura en el tejido tratado se realizó una vez por minuto documentando todas las temperaturas (*graf. 2*).

El objetivo de este estudio consistió en analizar la seguridad y aplicabilidad de la hipertermia como tratamiento en clínica veterinaria. Con la evaluación de la eficacia como objetivo secundario.

La toxicidad asociada a la hipertermia fue evaluada de acuerdo con el esquema de morbilidad aguda por radiación propuesto por el *Veterinary Radiation Therapy Oncology Group* (VROG) (grados 1-3) (148). La toxicidad asociada a la doxorubicina fue evaluada de acuerdo con los criterios propuestos por el *Veterinary Cooperative Oncology Group* (VCOG) en el tratamiento con quimioterapia o fármacos biológicos antineoplásicos en perros y gatos (grados 1-5) (149). Examen físico general, hemograma y perfil bioquímico dos semanas después de cada ciclo de

quimioterapia fueron programados. Además de un examen ecocardiográfico al finalizar el tratamiento.

La eficacia del tratamiento en los pacientes del grupo 1 fue evaluada de acuerdo con los criterios de evaluación de la respuesta de tumores sólidos por el VCOG (150). Mediciones del tumor y documentación fotográfica fue realizada antes de cada tratamiento.

La eficacia del tratamiento en los pacientes del grupo 2 fue evaluada según el tiempo libre de enfermedad y el tiempo de supervivencia de los pacientes. Se pautaron un examen físico y un examen ecográfico mensuales junto con los controles analíticos durante el transcurso del tratamiento y cada 8 semanas una vez finalizado el tratamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. GRUPO 1. HIPERTERMIA LOCAL

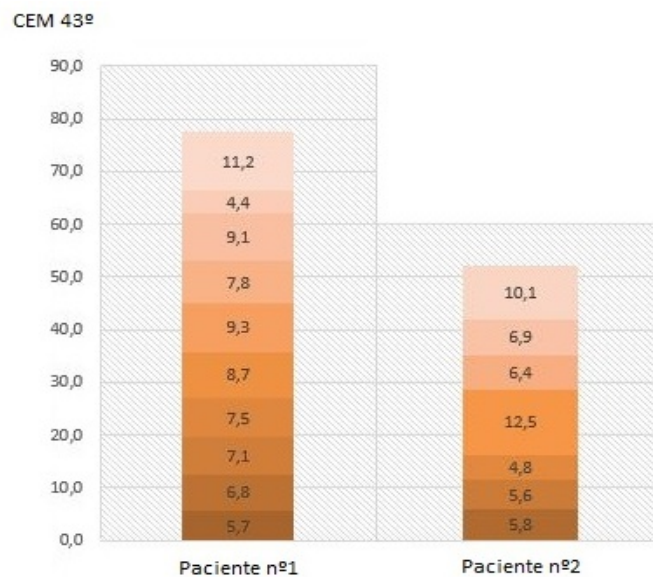


Gráfico 1. Valores de CEM 43°C en los pacientes del grupo 1. El paciente nº 1 completó las 10 sesiones de tratamiento mientras que el paciente nº 2 tan sólo recibió 7 sesiones. Nótese la diferencia en total acumulado.

- Paciente nº 1

El valor de T_{ave} obtenido durante el transcurso del tratamiento fue de 42,8°C. Dando como resultado 78 CEM 43°C y 7,8 CEM 43°C/sesión de promedio (*graf. 1*). El completo rasurado del pelaje tanto de la zona de aplicación como de la placa pasiva fue determinado indispensable antes de cada sesión. Se observó que este actuaba como aislante e interfería en la transmisión de la energía. El procedimiento fue aplicado al resto de pacientes.

Con el paso de las sesiones el paciente (*fig. 3*) dejó de tolerar el tratamiento adecuadamente. A partir de la 3ª sesión se optó por la sedación. Un aumento de la temperatura corporal fue observado durante el tratamiento con un incremento máximo de 0,15°C. Sin embargo, temperatura y tolerancia del tratamiento no parecieron mostrar relación puesto que el paciente no lo toleraba desde su inicio. Nerviosismo e incomodidad se determinaron como causas posibles.

La evaluación de la toxicidad asociada al tratamiento mostró efectos adversos en piel de grado 1 en forma de eritema y descamación en la zona de aplicación. La condición de dermatitis atópica del paciente pudo tener un papel decisivo. Dos semanas tras finalizar el tratamiento desaparecieron todos los signos.

La evaluación de la eficacia del tratamiento en la lesión diana en M3 mostró respuesta parcial al tratamiento (PR) reduciendo un 30% su tamaño (*fig. 2*). Al mismo tiempo, la lesión no diana en M6 mostró enfermedad progresiva (PD) aumentando su tamaño en un 78%. Esta diferencia entre la tratada y no tratada evidencia el efecto del tratamiento.



Figura 2. Mediciones del tumor en M3 en las sesiones 1 (1,4cm) y 10 (0,95cm).

Los tumores de la glándula mamaria son frecuentes en perros de edad media-avanzada. En la literatura el uso de la hipertermia en este tipo de cáncer ha demostrado aportar beneficios dentro de terapias multimodales tanto en humanos (40) como en perros (115). El resultado obtenido en el caso estudiado muestra beneficios en términos de control local al utilizar la hipertermia como tratamiento único.



Figura 3. Paciente nº 1 siendo tratado

- Paciente nº 2

El propietario no respetó las pautas de tratamiento comprometiendo la evaluación de los resultados del estudio.

El valor de T_{ave} obtenido durante el transcurso del tratamiento fue de 42,7°C. Dando como resultado 48 CEM 43°C y 6,8 CEM43º/sesión de promedio. El paciente (*fig. 4*) no toleró el tratamiento desde el día uno probablemente debido al dolor agudo a causa de la ulceración del tumor. Se optó por utilizar la sedación. Un aumento de la temperatura corporal fue observado durante las sesiones con un incremento máximo de 0,2°C. El paciente mostró deterioro en su salud no asociado a la enfermedad. Su condición de bronquitis crónica se agravó considerablemente provocando la suspensión del tratamiento el día de la 4ª sesión. Tras 20 días de interrupción se reinició el protocolo. Los mismo síntomas reaparecieron el día de la 9ª sesión y se decidió dar el tratamiento por finalizado.

La evaluación de la toxicidad asociada al tratamiento mostró efectos adversos en piel de grado 3 después de la sesión nº 5 en forma de ulceración y necrosis. Un pico de T_{max} de 45,6°C registrado durante el transcurso de esa sesión explicaría la aparición de dichos efectos (*graf. 2*). La lesión curó en el transcurso de dos semanas sin interferir en el protocolo de tratamiento. La evaluación de la eficacia del tratamiento de la lesión diana fue determinada como no evaluable (NE) cuando el propietario dejó de cumplir las pautas de tratamiento. Además, el tratamiento debió concluirse antes de termino por el deterioro de la salud general del paciente.

No obstante, la lesión diana mostró claros signos de enfermedad progresiva (PD) aumentando en más de un 20% su tamaño.

El carcinoma de células escamosas con localización perianal está poco descrito en la literatura. Cirugía, radioterapia y quimioterapia son los tratamientos convencionales de elección. La hipertermia ha demostrado producir la remisión completa de carcinomas de células escamosas en estudios en perros y gatos (5, 151). No obstante, las dosis utilizadas en esos estudios eran superiores a las del caso clínico presentado.

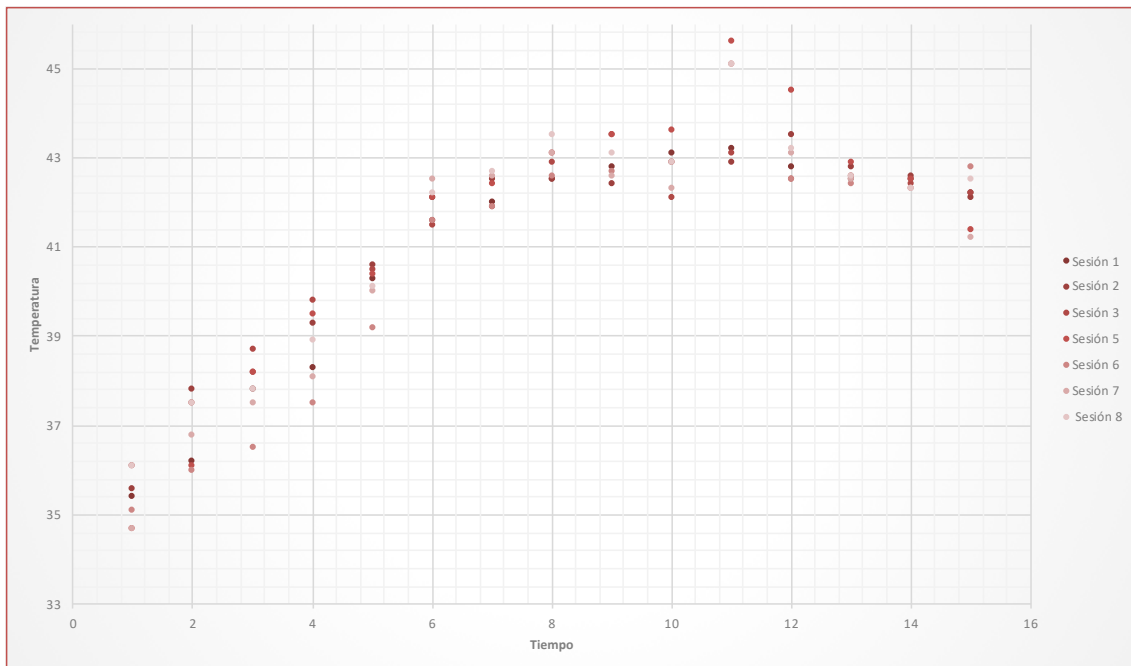


Gráfico 2 Ejemplo de la distribución de la temperatura durante el tratamiento en uno de los pacientes (paciente nº 2). Nótese el incremento paulatino de la temperatura durante los 5 minutos iniciales y el pico de T_{max} de 45,6°C ocurrido en la sesión nº 5.



Figura 4. Paciente nº 2 siendo tratado

5.2. Grupo 2. Cirugía, quimioterapia e hipertermia

- Paciente nº 3

La cirugía se llevó a cabo de forma satisfactoria realizándose una esplenectomía. Los ciclos de quimioterapia combinado con la hipertermia regional no relevaron incidencias destacables. El paciente (*fig. 5*) mostró tolerancia al tratamiento durante las 5 sesiones por lo que la sedación no fue necesaria. El valor de T_{ave} obtenido durante el transcurso del tratamiento fue de 41,6°C. Un aumento de la temperatura corporal fue observado durante el tratamiento con un incremento máximo de 0,15°C.

La evaluación de la toxicidad asociada a la hipertermia no mostró efectos adversos de ningún tipo. La evaluación de la toxicidad asociada al quimioterápico no mostró evidencias de depresión de la medula ósea ni alteración en los marcadores hepáticos y renales. El examen ecocardiográfico no evidenció signos visibles de daño en el miocardio.

La evaluación de la eficacia no logró documentar tiempo libre de enfermedad ni tiempo de supervivencia debido a la finalización del estudio previo al cumplimiento de dichos sucesos. El paciente no mostró indicios de recurrencia en los controles mensuales durante el tratamiento ni a las 8 semanas post-tratamiento. Ganó peso y mostró una mejoría progresiva en el estado de anemia que le había provocado el tumor.

El tiempo de supervivencia estimado en un perro con un hemangiosarcoma esplénico en estadio II tras cirugía es de 19 a 86 días (1). La quimioterapia post-cirugía puede prolongar el tiempo de supervivencia. La doxorubicina es el fármaco más frecuentemente utilizado y estudios en los que se ha empleado estiman un tiempo de supervivencia de 123 días (152). Otros quimioterápicos registran valores superiores (179 días) (1). El tiempo sin enfermedad del paciente documentado al término del estudio fue de 172 días.



Figura 5. Paciente nº 3 siendo tratado

- Paciente nº 4

La cirugía consiguió retirar la masa intestinal con éxito mediante una enterectomía. No obstante, numerosas asas intestinales adyacentes se encontraron adheridas a la masa pudiendo quedar células remanentes al desunirlas. El paciente mostró tolerancia al tratamiento y la sedación no fue requerida. El valor de T_{ave} obtenido fue de 42,2°C. Un aumento de la temperatura corporal fue observado durante el tratamiento con un incremento máximo de 0,1°C. El tratamiento tuvo que darse por concluido cuando se habían realizado tan solo 2 sesiones por la progresión de la enfermedad.

La evaluación de la toxicidad asociada a la hipertermia de las 2 primeras sesiones no mostró efectos adversos de ningún tipo. La evaluación de la toxicidad asociada al quimioterápico no mostró evidencias de depresión de la médula ósea ni alteración en los marcadores hepáticos y renales.

La evaluación de la eficacia del tratamiento dio como resultado 54 días de tiempo libre de enfermedad y 54 días de tiempo de supervivencia. No se encontraron evidencias de recurrencia durante las evaluaciones y controles periódicos hasta el día en que el paciente compareció con un fallo multiorgánico. Se le realizó un examen ecográfico que reveló hallazgos compatibles con metástasis en ambos riñones, hígado y páncreas (*fig. 6*). Ese mismo día fue eutanasiado.

El linfoma alimentario en el perro es un tumor con pronóstico generalmente reservado. En un estudio de 20 casos clínicos tratados con quimioterapia el tiempo de supervivencia medio fue de 11 semanas (153). La forma gastrointestinal aislada del linfoma en el perro está poco documentada en la literatura. En estos casos la cirugía con o sin quimioterapia adyuvante es la terapia indicada (1). El tiempo de supervivencia del paciente nº 4 fue de 8 semanas. Posible remanencia de tejido tumoral y sospecha de linfoma de células T en el examen histopatológico podrían haber influido en el tiempo de supervivencia registrado.

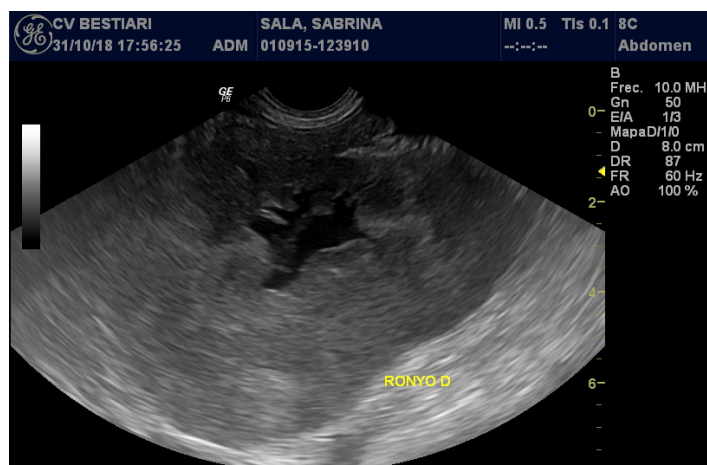


Figura 6. Imagen ecográfica del riñón derecho del paciente nº 4

6. CONCLUSIONES

De la elaboración de este trabajo se pueden obtener diversas conclusiones sobre el uso de la hipertermia en el tratamiento del cáncer. Las principales son:

1. Los progresos en la tecnología biomédica en los últimos años han permitido a la hipertermia superar muchos de los obstáculos que frenaron su expansión en la década de los noventa. Destacan la introducción de la termometría por resonancia magnética y el uso de la nanotecnología.
2. Cada vez es más extensa la experiencia clínica con resultados significativos que respalda el uso de esta terapia dentro del enfoque multimodal actual contra el cáncer.
3. Siguen existiendo incógnitas sobre su funcionamiento a nivel molecular e investigaciones futuras deberán incidir en el efecto que produce sobre aspectos como la inmunidad, el microambiente tumoral y la inflamación.
4. Modalidades de tratamiento de cáncer emergentes como la inmunoterapia y terapia génica presentan perspectivas de futuro prometedoras utilizadas junto a la hipertermia.
5. El marco práctico de este trabajo refleja la viabilidad y seguridad de esta técnica en la clínica veterinaria. La evaluación de la eficacia hace pensar que podría resultar útil en el tratamiento de ciertos tipos de tumores.
6. Posee las características adecuadas para integrarse en el tratamiento moderno del cáncer en la clínica veterinaria. Su aceptación y expansión pasa por la realización de estudios randomizados de calidad en diversos tipos de tumores.
7. Uno de los mayores obstáculos que se le presentan en la actualidad, es el peso de la inversión económica que supone la adquisición de equipamiento actualizado que garantice fiabilidad en los tratamientos.

○ Conclusions

Several conclusions were obtained from the completion of this assignment. The most significant ones are described in the following:

1. Recent progress in biomedical technology has helped hyperthermia overcome most of the obstacles that constrained its expansion in the late nineties. The appearance of magnetic resonance thermometry and the use of nanotechnology may be highlighted.
2. More and more quality clinical experience with significant results is becoming available

- everyday supporting the integration of hyperthermia in the current multimodal approach against cancer.
3. It is undeniable that there are still many questions about the molecular basis of hyperthermia that should be assessed. Effects involving immunity, tumour microenvironment and inflammation are subjects that researchers should further characterise.
 4. Emerging cancer treatment modalities such as immunotherapy and gene therapy hold a promising future combined with hyperthermia.
 5. The four clinical cases presented in this study exhibit the safety and feasibility of this treatment in small animal clinical practice. The evaluation of the treatment efficacy shows potential benefits on using it in some kinds of canine tumours.
 6. Hyperthermia has a large potential to play a substantial role in modern small animal clinical oncology. Its acceptance and expansion depend on the realization of high-quality randomized trials in different kinds of tumours.
 7. One of the major obstacles being faced at the moment is the magnitude of the economical investment needed to acquire updated equipment to assure reliable treatments.

7. VALORACIÓN PERSONAL

A lo largo de la realización de este trabajo he podido acercarme al mundo de la investigación científica y contemplar las posibilidades que ofrece en vista a un futuro cercano. Instruirme sobre un tema de actualidad por el cual sentía curiosidad. Aprender a documentarme de forma adecuada. Comprender cuales son las herramientas necesarias para la realización de estudios científicos válidos. Y, por último, darme cuenta de errores cometidos a lo largo del trabajo.

Para concluir, me gustaría agradecer la colaboración a *Capenergy, Medical, S.L.* por facilitarme la tecnología necesaria para la realización del estudio, a *Clínica Veterinaria Bestiari* por permitirme ponerla en práctica en sus instalaciones y agradecer también a mi tutor José Rodríguez por su ayuda y apoyo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Withrow SJ, Page R, Vail DM. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5th edition. US: Saunders; 2013.
2. Gas P. Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine. Prz Elektrotech 2017; 87(12):37-40.
3. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. Pharmacol Ther 1994;64(3):529-64.
4. Habash RWY. Principles applications risks and benefits of therapeutic hyperthermia. Front Biosci 2011;3(3):1169-81.
5. Grier RL, Brewer WG, Theilen GH. Hyperthermic treatment of superficial tumors in cats and dogs. J Am Vet Med Assoc 1980;177(3):227-33.
6. Perez CA, Pajak T, Emami B, Hornback NB, Tupchong L, Rubin P. Randomized Phase Iii Study Comparing Irradiation and Hyperthermia with Irradiation Alone in Superficial Measurable Tumors: Final Report by the Radiation Therapy Oncology Group. Am J Clin Oncol 1991;14(2):133-41.
7. Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40-46°C): Cell killing and molecular events. Int J Hyperthermia 2008;24(1):3-15.
8. Szigeti Gyp. What is on the horizon in hyperthermic cancer therapy? J Tradit Med Clin Neuropath 2017;6(2):1-13.
9. Datta NR, Ordóñez SG, Gaipil US, Paulides MM, Crezee H, Gellermann J, et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. Cancer treat rev 2015;41(9):742-53.
10. Clifford L. K. Pang. Hyperthermia in oncology. 1a ed. England: Informa UK Ltd; 2015.
11. Issels R, Kampmann E, Kanaar R, Lindner LH. Hallmarks of hyperthermia in driving the future of clinical hyperthermia as targeted therapy: translation into clinical application. Int J Hyperthermia 2016;32(1):89-95.
12. Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. Int J Hyperthermia 1994;10(4):457-83.
13. Van Rhoon GC. Mild Hyperthermia in Cancer Therapy. [Presentación de powerpoint]. Erasmus MC Cancer Institute. Universidad de Rotterdam. [publicado en 2015; citado en el 21 de Noviembre 2018] Disponible en: https://www.icnirp.org/cms/upload/presentations/Thermo/ICNIRPWHOThermo_2015_vanRhoon.pdf
14. Peeken JC, Combs SE, Combs SE. Integrating Hyperthermia into Modern Radiation Oncology: What Evidence Is Necessary? Front Oncol 2017; 7(132): 1-17.
15. Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. Eur J Cancer 2008;44(17):2546-54.
16. Kokura S, Yoshikawa T, Ohnishi T. Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside. 1a ed. Singapore: Springer Singapore; 2016.
17. Toraya-Brown S, Fiering S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. Int J Hyperthermia 2014;30(8):531-9.
18. Dewhurst MW, Lee C, Ashcraft KA. The future of biology in driving the field of hyperthermia. Int J Hyperthermia 2016;32(1):4-13.
19. AlbaHyperthermia: Hyperthermia System products; ALBA 4D, Double ON4000, ON4000, ALBA HPA 434 MHz [Internet]. Italia: 2017; Disponible en: <http://www.albahyperthermia.com/hyperthermia-products.html>
20. Pyrexar Medical: BSD-2000 Microwave Hyperthermia System [Internet]. Estados Unidos: 2017; Disponible en <https://www.pyrexar.com/hyperthermia/bsd-2000>
21. Mellal I, Oukaira A, Kengene E, Lakhssassi A. Thermal Therapy Modalities for Cancer Treatment: A Review and Future Perspectives. Int J Appl Sci – Res Rev 2017;4(02).
22. Van Rhoon GC, Paulides MM, Drizdal I, Franckena M. Hyperthermia and the need to monitor temperature. International Conference on Electromagnetics in Advanced Applications (ICEAA). Turin, Italy 2015. IEEE Xplore digit.library [Internet]. 2015 [citado 21 Nov 2018]. 1181-85. Disponible en: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7297305/metrics#metrics>
23. Uddin N, Elshafiey I. Enhanced Energy Localization in Hyperthermia Treatment Based on Hybrid Electromagnetic and Ultrasonic System: Proof of Concept with Numerical Simulations. BioMed Res Int 2017;1-18.
24. Kok HP, Wust P, Stauffer JC, Bardati F, Rhoon G, Crezee J. Current state of the art of regional hyperthermia treatment planning: A review. Rad Oncol 2015;10(1):1-9.
25. Bruggmoser G, Bauchowitz S, Canters R, Crezee H, Ehmann M, Gellermann J, et al. Guideline for the clinical application, documentation and analysis of clinical studies for regional deep hyperthermia. Strahlenther Onkol 2012;188(2):198-211.
26. Myerson RJ, Moros EG, Diederich CJ, Haemmerich D, Hurwitz MD, Hsu I-J, et al. Components of a hyperthermia clinic: Recommendations for staffing, equipment, and treatment monitoring. Int J Hyperthermia 2014;30(1):1-5.
27. Dobšiček Trefná H, Crezee J, Schmidt M, Marder D, Lamprecht U, Ehmann M, et al. Quality assurance guidelines for superficial hyperthermia clinical trials. Strahlenther Onkol 2017;193(5):351-66.
28. Cappiello G, McGinley B, Elahi MA, Drizdal T, Paulides MM, Glavin M, et al. Differential Evolution Optimization of the SAR Distribution for Head and Neck Hyperthermia. IEEE Trans Biomed Eng 2017;64(8):1-11.
29. Vincze G, Szasz O, Szasz A. Generalization of the Thermal Dose of Hyperthermia in Oncology. Open Journal of Biophysics 2015;5(4):97-114.

30. Sohail A, Ahmad Z, Bég OA, Arshad S, Sherin L. A review on hyperthermia via nanoparticle-mediated therapy. *Bulletin du Cancer* 2017;104(5):452-61.
31. Zimmermann K, Hossann M, Hirschberger J, Troedson K, Peller M, Schneider M, et al. A pilot trial of doxorubicin containing phosphatidylglycerol based thermosensitive liposomes in spontaneous feline soft tissue sarcoma. *Int J Hyperthermia* 2017;33(2):178-90.
32. Szasz A, Szasz O, Szasz N. Physical background and technical realizations of hyperthermia. En: Gian F. Baronzio. *Hyperthermia in Cancer Treatment*. 1a ed. Estados Unidos: Medical Intelligence Unit; 2006. P. 27-52.
33. Stauffer PR. Evolving technology for thermal therapy of cancer. *Int J Hyperthermia* 2005;21(8):731-44.
34. Kok HP, Crezee J. A comparison of the heating characteristics of capacitive and radiative superficial hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2017; 10(196):1-9.
35. Kroeze H, Kokubo M, Van de Kamer JB, De Leeuw AAC, Kikuchi M, Hiraoka M, et al. Comparison of a Capacitive and a Cavity Slot Radiative Applicator for Regional Hyperthermia. *Japanese Journal of Hyperthermic Oncology* 2002;18(2):75-91.
36. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002;3(8):487-97
37. Takagi H, Azuma K, Osaki T, Itoh N, Nakazumi S, Taura Y, et al. High temperature hyperthermia treatment for canines exhibiting superficial tumors: A report of three cases. *Oncol Lett* 2014;8(5):2055-8.
38. Yang T, Case JB, Boston S, Dark MJ, Toskich B. Microwave ablation for treatment of hepatic neoplasia in five dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2016;250(1):79-85.
39. Soares PIP, Ferreira IMM, Igreja, Rui A G B N, Novo CMM, Borges, Joao P M R. Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2012;7(1):64-73.
40. Zagar TM, Oleson JR, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Craciunescu OI, Blackwell KL, et al. Hyperthermia combined with radiation therapy for superficial breast cancer and chest wall recurrence: A review of the randomised data. *Int J Hyperthermia* 2010;26(7):612-7.
41. Overgaard J, Gonzalez DG, Hulshof, M. C. C. H, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, et al. Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. *Int J Hyperthermia* 1996;12(1):3-20.
42. Fuwa N, Nomoto Y, Shouji K, Kodaira T, Kamata M, Ito Y. Therapeutic effects of simultaneous intraluminal irradiation and intraluminal hyperthermia on oesophageal carcinoma. *Br J Radiol* 2001;74(884):709-14.
43. Sharma M, Balasubramanian S, Silva D, Barnett GH, Mohammadi AM. Laser interstitial thermal therapy in the management of brain metastasis and radiation necrosis after radiosurgery: An overview. *Expert Rev Neurother* 2016;16(2):223-32.
44. Seifert G, Budach V, Keilholz U, Wust P, Eggert A, Ghadjar P. Regional hyperthermia combined with chemotherapy in paediatric, adolescent and young adult patients: current and future perspectives. *Rad oncol* 2016;11(1):65-72.
45. Sminia P, Zee JVD, Wondergem J, Haveman J. Effect of hyperthermia on the central nervous system: A review. *Int J Hyperthermia* 1994;10(1):1-30.
46. Zwischenberger JB, Vertrees RA, Bedell EA, McQuitty CK, Chernin JM, Woodson LC. Percutaneous venovenous Perfusion-Induced systemic hyperthermia for lung cancer: a phase I safety study. *Ann Thorac Surg* 2004;77(6):1916.
47. Papadia F, Basso V, Patuzzo R, Maurichi A, Florio AD, Zardi L, et al. Isolated limb perfusion with the tumor-targeting human monoclonal antibody-cytokine fusion protein L19-TNF plus melphalan and mild hyperthermia in patients with locally advanced extremity melanoma. *J Surg Oncol* 2013;(2):173-9.
48. Kireeva G, Yastrebov I, Surov D, Belyaev A, Solovyev I, Lopota A, et al. P2-071Hyperthermic Isolated Pelvic Perfusion to Treat Pelvic Malignancies: First Russian Experience [Abstract]. *Ann Oncol* 2016;27(7).
49. Ben-Shabat I, Belgrano V, Ny L, Nilsson J, Lindnér P, Bagge RO. Long-Term Follow-Up Evaluation of 68 Patients with Uveal Melanoma Liver Metastases Treated with Isolated Hepatic Perfusion. *Ann Surg Oncol* 2016;23(4):1327-34.
50. Ambroggi MC, Korasidis S, Lucchi M, Fanucchi O, Giarratana S, Melfi F, et al. Pleural recurrence of thymoma: surgical resection followed by hyperthermic intrathoracic perfusion chemotherapy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49(1):321-6.
51. Ahmed S, Stewart JH, Shen P, Votanopoulos KI, Levine EA. Outcomes with cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal metastasis. *J Surg Oncol* 2014;110(5):575-84.
52. Cihoric N, Tsikkinis A, van Rhoon G, Crezee H, Aebbersold DM, Bodis S, et al. Hyperthermia-related clinical trials on cancer treatment within the ClinicalTrials.gov registry. *Int J Hyperthermia* 2015;31(6):609-14.
53. Andocs G, Szasz O, Szasz A. Oncothermia Treatment of Cancer: From the Laboratory to Clinic. *Electroman biol med* 2009;28(2):148-65.
54. Gao S, Zheng M, Ren X, Tang Y, Liang X. Local hyperthermia in head and neck cancer: mechanism, application and advance. *Oncotarget* 2016;7(35):57367-78.
55. Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother* 2006 Mar;55(3):320-8.
56. Espinosa A, Di Corato R, Kolosnjaj-Tabi J, Flaud P, Pellegrino T, Wilhelm C. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano* 2016;10(2):2436-46.

57. Hoopes PJ, Moodie KL, Petryk AA, Petryk JD, Sechrist S, Gladston DJ, et al. Hypo-fractionated radiation, magnetic nanoparticle hyperthermia and a viral immunotherapy treatment of spontaneous canine cancer. *J Biomed Opt* 2017;11-22.
58. Dewhirst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, Hanson M, Hoopes PJ. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003;19(3):267-94.
59. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144(5):646-674.
60. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia* 2014;30(7):513-23.
61. Du J, Di H, Guo L, Li Z, Wang G. Hyperthermia causes bovine mammary epithelial cell death by a mitochondrial-induced pathway. *J Therm Biol* 2008;33(1):37-47.
62. Vaupel PW, Kelleher DK. Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: heterogeneity is the key issue. *Int J Hyperthermia* 2010;26(3):211-23.
63. Mbeunkui F, Johann Jr D. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63(4):571-82.
64. Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, Danhier P, Gallez B, Batinic-Haberle I, et al. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(47):20477-82.
65. Vaupel P, Multhoff G. Hypoxia-/HIF-1 α -Driven Factors of the Tumor Microenvironment Impeding Antitumor Immune Responses and Promoting Malignant Progression. *Adv Exp Med Biol* 2018;171-5.
66. Song CW, Shakil A, Osborn JL, Iwata K. Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. *Int J Hyperthermia* 1996;12(3):367-73.
67. Sen A, Capitano ML, Sperryak JA, Schueckler JT, Thomas S, Singh AK, et al. Mild elevation of body temperature reduces tumor interstitial fluid pressure and hypoxia and enhances efficacy of radiotherapy in murine tumor models. *Can Res* 2011;71(11):3872-80.
68. Thrall DE, LaRue SM, Pruitt AF, Case B, Dewhirst MW. Changes in tumour oxygenation during fractionated hyperthermia and radiation therapy in spontaneous canine sarcomas. *Int J Hyperthermia* 2006;22(5):365-73.
69. Roca C, Primo L, Valdembri D, Cividalli A, Declerck P, Carmeliet P, et al. Hyperthermia Inhibits Angiogenesis by a Plasminogen Activator Inhibitor 1-dependent Mechanism. *Can Res* 2003;63(7):1500-7.
70. Kaur P, Hurwitz MD, Krishnan S, Asea A. *Cancers* 2011;3(4):3799-823.
71. Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, Stap J, Rodermond H, Odijk H, et al. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(24):9851-6.
72. Oei AL, Vriend LEM, Crezee J, Franken NAP, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Rad oncol* 2015;10(1):165-78.
73. Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW. Temperature Matters! And Why it Should Matter to Tumor Immunologists. *Cancer Immunol Res* 2013;1(4):210-6.
74. Julie R. Ostberg, Baris E. Dayanc, Min Yuan, Ezogelin Oflazoglu, Elizabeth A. Repasky. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells. *J leukoc Biol* 2007;82(5):1322-31.
75. Mace TA, Zhong L, Kokolus KM, Repasky EA. Effector CD8+ T cell IFN- γ production and cytotoxicity are enhanced by mild hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2012;28(1):9-18.
76. Peng JC, Hyde C, Pai S, O'Sullivan BJ, Nielsen LK, Thomas R. Monocyte-derived DC Primed With TLR Agonists Secrete IL-12p70 in a CD40-dependent Manner Under Hyperthermic Conditions. *J Immunother* 2006;29(6):606-15.
77. Chen T, Guo J, Yang M, Zhu X, Cao X. Chemokine-Containing Exosomes Are Released from Heat-Stressed Tumor Cells via Lipid Raft-Dependent Pathway and Act as Efficient Tumor Vaccine. *J Immunol* 2011;186(4):2219-28.
78. Chen T, Guo J, Han C, Yang M, Cao X. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *J Immunol* 2009;182(3):1449-59.
79. Westerheide SD, Morimoto RI. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem* 2005;280(39):33097-100.
80. Calderwood SK, Theriault JR, Gong J. How is the immune response affected by hyperthermia and heat shock proteins? *Int J Hyperthermia* 2005;21(8):713-6.
81. ICNIRP International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (100 khz to 300 ghz). Appendix A: Review of Studies on Dosimetry. [actualizado 11 Jul 2018; citado 22 Nov 2018]; 1-25. Disponible en: <https://www.icnirp.org/en/activities/public-consultation/consultation-1.html>
82. Van Rhoon GC. Is CEM43 still a relevant thermal dose parameter for hyperthermia treatment monitoring? *Int J Hyperthermia* 2016;32(1):50-62.
83. Leopold KA, Dewhirst M, Samulski T, Harrelson J, Tucker JA, George SL, et al. Relationships among tumor temperature, treatment time, and histopathological outcome using preoperative hyperthermia with radiation in soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22(5):989-98.

84. De Bruijne M, Holt B, van Rhoon G, van der Zee J. Evaluation of CEM43°C_{T90} Thermal Dose in Superficial Hyperthermia. *Strahlenther Onkol* 2010;186(8):436-43.
85. Franckena M, Fatehi D, de Bruijne M, del Canters AMR, van Norden Y, Mens WJ, et al. Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia. *Eur J Can* 2009;45(11):1969-78.
86. Thrall DE, LaRue SM, Yu D, Samulski T, Sanders L, Case B, et al. Thermal dose is related to duration of local control in canine sarcomas treated with thermoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(14):5206-14.
87. Van der Zee J, Peer-Valstar JN, Rietveld PJ, de Graaf-Strukowska L, van Rhoon GC. Practical limitations of interstitial thermometry during deep hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;40(5):1205-12.
88. Weihrauch M, Wust P, Weiser M, Nadobny J, Eisenhardt S, Budach V, et al. Adaptation of antenna profiles for control of MR guided hyperthermia (HT) in a hybrid MR-HT system. *Med Phys* 2007;34(12):4717-25.
89. ICNIRP International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (100 khz to 300 ghz). [actualizado 11 Jul 2018; citado 22 Nov 2018]; 1-25. Disponible en: <https://www.icnirp.org/en/activities/public-consultation/consultation-1.html>
90. Habash R. Bioeffects and therapeutic applications of electromagnetic energy. 1a ed. Estados Unidos: CRC Press; 2007.
91. ICNIRP International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (100 khz to 300 ghz). Appendix B: Health Risk Assessment Literature [actualizado 11 Jul 2018; citado 22 Nov 2018] Disponible en: <https://www.icnirp.org/en/activities/public-consultation/consultation-1.html>
92. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;43(1):33-56.
93. Foster KR, Ziskin MC, Balzano Q. Thermal Modeling for the Next Generation of Radiofrequency Exposure Limits: Commentary. *Health phys* 2017;113(1):41-53.
94. Adibzadeh F, Bakker JF, Paulides MM, Verhaart RF, Rhoon GCv. Impact of head morphology on local brain specific absorption rate from exposure to mobile phone radiation. *Bioelectromagnetics* 2015;36(1):66-76.
95. Yarmolenko PS, Moon EJ, Landon C, Manzoor A, Hochman DW, Viglianti BL, et al. Thresholds for thermal damage to normal tissues: an update. *Int J Hyperthermia* 2011;27(4):320-43.
96. Takahashi S, Tanaka R, Watanabe M, Takahashi H, Kakinuma K, Suda T, et al. Effects of whole-body hyperthermia on the canine central nervous system. *Int J Hyperthermia* 1999;15(3):203-16.
97. Ziskin MC, Morrissey J. Thermal thresholds for teratogenicity, reproduction, and development. *Int J Hyperthermia* 2011;27(4):374-387.
98. Sommer AM, Grote K, Reinhardt T, Streckert J, Hansen V, Lerchl A. Effects of Radiofrequency Electromagnetic Fields (UMTS) on Reproduction and Development of Mice: A Multi-generation Study. *J Radiat Oncol Res* 2009;171(1):89-95.
99. Dewhirst MW, Lora-Michiels M, Viglianti BL, Dewey WC, Repacholi M. Carcinogenic effects of hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003;19(3):236-51.
100. Lerchl A, Klose M, Grote K, Wilhelm AFX, Spathmann O, Fiedler T, et al. Tumor promotion by exposure to radiofrequency electromagnetic fields below exposure limits for humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;459(4):585-90.
101. Van Der Zee J, De Bruijne M, Mens JWM, Ameziane A, Broekmeyer-Reurink MP, Drizdal T, et al. Reirradiation combined with hyperthermia in breast cancer recurrences: Overview of experience in Erasmus MC. *Int J Hyperthermia* 2010;26(7):638-48.
102. Franckena M, Van Der Zee J. Use of combined radiation and hyperthermia for gynecological cancer. *Curr Opin Gynecol Obstet* 2010;22(1):9-14.
103. Page RL, Thrall DE. Clinical Indications and Applications of Radiotherapy and Hyperthermia in Veterinary Oncology. *Veterinary Clinics of North America: Small Anim Pract* 1990;20(4):1075-92.
104. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Rad oncol* 2012;7(1):162-71.
105. Vernon CC, Hand JW, Field SB, Machin D, Whaley JB, van der Zee J, et al. Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials. *International Collaborative Hyperthermia Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35(4):731-44.
106. Huilgol NG, Gupta S, Sridhar CR. Hyperthermia with radiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a report of randomized trial. *J Cancer Res Ther* 2010;6(4):492-6.
107. Van der Zee J, González González D, van Rhoon GC, van Dijk JD, van Putten WL, Hart AA. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. *Dutch Deep Hyperthermia Group. Lancet* 2000;355(9210):1119-25.
108. Jones EL, Oleson JR, Prosnitz LR, Samulski TV, Vujaskovic Z, Yu D, et al. Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors. *J Clin Oncol* 2005;23(13):3079-85.
109. Mitsumori M, Zeng Z, Oliynychenko P, Park JH, Choi IB, Tatsuzaki H, et al. Regional hyperthermia combined with radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancers: a multi-institutional prospective randomized trial of the International Atomic Energy Agency. *Int J Clin Oncol* 2007;12(3):192-98.
110. Gillette EL, McChesney SL, Dewhirst MW, Scott RJ. Response of canine oral carcinomas to heat and

- radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;13(12):1861-7.
111. Gillette SM, Dewhirst MW, Gillette EL, Thrall DE, Page RL, Powers BE, et al. Response of canine soft tissue sarcomas to radiation or radiation plus hyperthermia: a randomized phase II study. *Int J Hyperthermia* 1992;8(3):309-20.
 112. Denman DL, Legorreta RA, Kier AB, Elson HR, White ML, Buncher CR, et al. Therapeutic responses of spontaneous canine malignancies to combinations of radiotherapy and hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21(2):415-22.
 113. Dewhirst MW, Sim DA, Sapareto S, Connor WG. Importance of minimum tumor temperature in determining early and long-term responses of spontaneous canine and feline tumors to heat and radiation. *Cancer Res* 1984;44(1):43-50.
 114. Dewhirst MW, Sim DA, Forsyth K, Grochowski KJ, Wilson S, Bicknell E. Local control and distant metastases in primary canine malignant melanomas treated with hyperthermia and/or radiotherapy. *Int J Hyperthermia* 1985;1(3):219-34.
 115. Legorreta RA, Denman DL, Kelley MC, Lewis GC. Use of hyperthermia and radiotherapy in treatment of a large mast cell sarcoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193(12):1545-1548.
 116. Brewer WG Jr, Turrel JM. Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of fibrosarcomas in the dog [Abstract]. *J Am Vet Med Assoc* 1982;181(2):146-50.
 117. Thompson JM, Gorman NT, Bleehen NM, Owen LM, White RAS. Hyperthermia and radiation in the management of canine tumours. *Journal of Small Anim Pract* 1987;28(6):457-77.
 118. Richardson R, Anderson V, Voorhees W, Blevins W, Inskeep T, Janas W, et al. Irradiation-Hyperthermia in Canine Hemangiopericytomas: Large-Animal Model for Therapeutic Response. *Jour Nat Cancer Inst* 1984;73(5):1187-94.
 119. Frew DG, Dobson JM, Stenning SP, Bleehen NM. Response of 145 spontaneous canine head and neck tumours to radiation versus radiation plus microwave hyperthermia: results of a randomized phase III clinical study. *Int J Hyperthermia* 1995;11(2):217-30.
 120. Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJR, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res* 2005;11(19):6944-49.
 121. van Valenberg, F Johannes P, van der Heijden, Antoine G, Lammers RJM, Falke J, Arends TJH, Oosterwijk E, et al. Intravesical radiofrequency induced hyperthermia enhances mitomycin C accumulation in tumour tissue. *Int J Hyperthermia* 2018;34(7):988-93.
 122. Wessalowski R, Schneider DT, Mils O, Friemann V, Kyrilloupolou O, Schaper J, et al. Regional deep hyperthermia for salvage treatment of children and adolescents with refractory or recurrent non-testicular malignant germ-cell tumours: an open-label, non-randomised, single-institution, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14(9):843-52.
 123. Huilgol NG, Gupta S, Dixit R. Chemoradiation with hyperthermia in the treatment of head and neck cancer. *Int J Hyperthermia* 2010;26(1):21-5.
 124. Miller RC, Richards M, Baird C, Martin S, Hall EJ. Interaction of hyperthermia and chemotherapy agents; cell lethality and oncogenic potential. *Int J Hyperthermia* 1994;10(1):89-99.
 125. P J McCormick, J S Bertram. Differential cell cycle phase specificity for neoplastic transformation and mutation to ouabain resistance induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in synchronized C3H10T 1/2 C18 cells. *Proc Natl Acad Sci U.S Am* 1982;79(14):4342-6.
 126. Angele MK, Albertsmeier M, Prix NJ, Hohenberger P, Abdel-Rahman S, Dieterle N, et al. Effectiveness of regional hyperthermia with chemotherapy for high-risk retroperitoneal and abdominal soft-tissue sarcoma after complete surgical resection: a subgroup analysis of a randomized phase-III multicenter study. *Ann Surg* 2014;260(5):749-56.
 127. Chua TC, Moran BJ, Sugarbaker PH, Levine EA, Glehen O, Gilly FN, et al. Early and long-term outcome data on 2,298 patients with pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol* 2012;30(20):2449-56.
 128. Colombo R, Salonia A, Leib Z, Pavone-Macaluso M, Engelstein D. Long-term outcomes of a randomized controlled trial comparing thermochemotherapy with mitomycin-C alone as adjuvant treatment for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). *BJU International* 2011;107(6):912-18.
 129. Shen H, Li X, Wu C, Yin Y, Wang R, Shu Y. The regimen of gemcitabine and cisplatin combined with radio frequency hyperthermia for advanced non-small cell lung cancer: A phase II study. *Int J Hyperthermia* 2011;27(1):27-32.
 130. Tschoep KE, Boeck S, Berger F, Maier V, Abdel-Rahman S, Kuhlencordt M, et al. Regional hyperthermia (RHT) combined with gemcitabine (GEM) + cisplatin (CIS) in patients with GEM-refractory advanced pancreatic cancer: Results of the ESHO phase II trial. *JCO* 2008;26(15):4635-44.
 131. Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wessalowski R, Reichardt P, Wust P, et al. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma: The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2018;4(4):483-92.
 132. Woll PJ, van Glabbeke M, Hohenberger P, Le Cesne A, Gronchi A, Hoekstra HJ, et al. Adjuvant chemotherapy (CT) with doxorubicin and ifosfamide in resected soft tissue sarcoma (STS): Interim analysis of a randomised phase III trial. *JCO* 2007;25(18):10008-10008.
 133. Marmor JB. Interactions of Hyperthermia and Chemotherapy in Animals. *Cancer Res* 1979;39(6):2269-76.
 134. Théon AP, Madewell BR, Moore AS, Stephens C, Krag DN. Localized thermo-cisplatin therapy: A pilot study

- in spontaneous canine and feline tumours. *Int J Hyperthermia* 1991;7(6):881-92.
135. Page RL, Macy DW, Ogilvie GK, Rosner GL, Dewhirst MW, Thrall DE, et al. Phase III evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma. *Int J Hyperthermia* 1992;8(2):187-97.
136. Larue SM, Fox MH, Ogilvie GK, Page RL, Getzy DM, Thrall DE, et al. Tumour cell kinetics as predictors of response in canine lymphoma treated with chemotherapy alone or combined with whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1999;15(6):475-86
137. Zimmermann K, Hossann M, Hirschberger J, Troedson K, Peller M, Schneider M, et al. A pilot trial of doxorubicin containing phosphatidylglycerol based thermosensitive liposomes in spontaneous feline soft tissue sarcoma. *Int J Hyperthermia* 2017;33(2):178-90.
138. Marlene L. Hauck, Susan M. LaRue, William P. Petros, Jean M. Poulson, Daohai Yu, Ivan Spasojevic, et al. Phase I Trial of Doxorubicin-Containing Low Temperature Sensitive Liposomes in Spontaneous Canine Tumors. *Clin Can Res* 2006;12(13):4004-10.
139. Staruch RM, Hynynen K, Chopra R. Hyperthermia-mediated doxorubicin release from thermosensitive liposomes using MR-HIFU: Therapeutic effect in rabbit Vx2 tumours. *Int J Hyperthermia* 2015;31(2):118-33.
140. Ahmed S, Stewart JH, Shen P, Votanopoulos KI, Levine EA. Outcomes with cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal metastasis. *J Surg Oncol* 2014;110(5):575-84.
141. Ambrogi MC, Korasidis S, Lucchi M, Fanucchi O, Giarratana S, Melfi F, et al. Pleural recurrence of thymoma: surgical resection followed by hyperthermic intrathoracic perfusion chemotherapy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49(1):321-6.
142. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 2014;515(7528):577-81.
143. Papadia F, Basso V, Patuzzo R, Maurichi A, Florio AD, Zardi L, et al. Isolated limb perfusion with the tumor-targeting human monoclonal antibody-cytokine fusion protein L19-TNF plus melphalan and mild hyperthermia in patients with locally advanced extremity melanoma. *J Surg Oncol* 2013;107(2):173-9.
144. Tabuchi Y, Takasaki I, Wada S, Zhao Q, Hori T, Nomura T, et al. Genes and genetic networks responsive to mild hyperthermia in human lymphoma U937 cells. *Int J Hyperthermia* 2008;24(8):613-22.
145. Chi J, Thrall DE, Jiang C, Snyder S, Fels D, Landon C, et al. Comparison of genomics and functional imaging from canine sarcomas treated with thermoradiotherapy predicts therapeutic response and identifies combination therapeutics. *Am J Clin Cancer Res* 2011;17(8):2549-60.
146. Siddiqui F, Li C, LaRue SM, Poulson JM, Avery PR, Pruitt AF, et al. A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Ther* 2007;6(1):380-9.
147. Biller B, Berg J, Garrett L, Ruslander D, Wearing R, Abbott B, et al. 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 2016;52(4):181-204.
148. American College of Veterinary Radiology, Veterinary Radiation Therapy Oncology Group. VRTOG Radiation Morbidity Scoring Scheme [Internet]. 2018 [citado 22 Nov 2018]. Disponible en: <https://www.acvr.org/page/vrtog>
149. Veterinary cooperative oncology group. Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.1. *Vet Comp Oncol* 2016;14(4):417-46
150. Nguyen SM, Thamm DH, Vail DM, London CA. Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet Comp Oncol* 2015;13(3):176-83.
151. Draelos ZK, Levine N. Hyperthermic treatment of cutaneous malignancies. *J Am Acad Dermatol* 1983;9(4):623.
152. Payne SE, Rassnick KM, Northrup NC, Kristal O, Chretien JD, Cotter SM, et al. Treatment of vascular and soft-tissue sarcomas in dogs using an alternating protocol of ifosfamide and doxorubicin. *Vet Comp Oncol* 2003;1(4):171-9.
153. Moore AS. Treatment of T cell lymphoma in dogs. *Vet Rec* 2016;179(11):277-83.