



Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

Tesis doctoral

**INFECCIÓN PERITONEAL POSTOPERATORIA Y RECURRENCIA
DEL CÁNCER COLORRECTAL:
ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN
E INVASIÓN DE CÉLULAS TUMORALES IN VITRO COMO
MECANISMOS RESPONSABLES DE ESTA ASOCIACIÓN**

SILVIA SALVANS RUIZ

Barcelona 2014

Directores:**Dr. Miguel Pera**

Profesor Asociado, Departamento de Cirugía, Universitat Autònoma de Barcelona.
Jefe de Sección de Cirugía Colorrectal, Servicio de Cirugía General, Hospital del Mar, Barcelona.
Coordinador del Grupo de Investigación en Cáncer Colorrectal, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques).

Dr. Luis Grande

Profesor Titular, Departamento de Cirugía, Universitat Autònoma de Barcelona.
Jefe del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Hospital del Mar, Barcelona.

Al Sr. Arguelles y a todos los pacientes que sufren las consecuencias de una dehiscencia anastomótica,

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pera. Creo que un buen profesional en el sector médico es clínico, docente e investigador. Y creo, no; estoy segura, que éste eres tu. Eres mi ejemplo a seguir. Sólo puedo decirte, gracias, gracias, gracias, ... y mil veces gracias, Miguel!

Al Dr. Mayol. La teva participació en totes les parts d'aquest treball ha estat imprescindible per arribar a la fi. Gràcies per compartir amb mi els teus coneixements, per instruir-me no només en el món dels cultius cel·lulars i per ensenyar-me a ser pacient davant dels resultats incoherents. Moltíssimes gràcies, Xavier!

Al Dr. Grande. Gràcies pel teu suport des del primer dia que vaig trepitjar l'Hospital del Mar, sempre m'has donat forces per esforçar-me cada dia més. Gràcies pels teus consells i per guiar-me en la meva formació com a cirurgiana. Espero no decepcionar-vos. Moltes gràcies, jefe!

Voldria també agrair a tots els pacients la seva generositat en participar en l'estudi. Tot i està en un moment difícil de les seves vides, no han dubtat en col-laborar en aquest treball.

Gràcies a l'equip mèdic i d'infermeria del Servei de Cirurgia General de l'Hospital del Mar. Gràcies als adjunts del Servei, dels qui he après tots aquests anys. Gràcies especialment als adjunts de la Unitat de Cirurgia Colorrectal que han estat al peu del canó per incloure malalts a l'estudi i perquè m'han ensenyat a estimar la cirurgia colorrectal. Gràcies als residents amb qui he compartit aquests anys de formació i han participat recollint mostres i ordenant la base de dades, de vegades, després de jornades inacabables. Gracias Leyre. Gràcies a l'equip d'infermeria de la sala d'hospitalització i quiròfan qui han col-laborat amb l'obtenció de mostres. A tots vosaltres, moltes gràcies per ajudar-me a posar punt

i final a aquesta tesi doctoral. I també moltes gràcies per ajudar-me a créixer com a professional i com a persona.

No hauria estat el mateix sense les meves companyes de despatx de l'IMIM, amb qui he compartit angoixes però també alegries. Gràcies Rita i Anna!

Eva, por todos estos momentos vividos antes, durante y después de nuestras tesis! Hubiese sido mucho más difícil sin ti!

Sóc molt afortunada de tenir els amics que tinc, mèdics i no mèdics. Tots m'heu recolzat quan en algun moment, he hagut de prioritzar la meva vida professional a la personal. Sé que a vegades pot ser difícil d'entendre. Intentaré compensar-vos-ho!

I no per ser els últims són els menys importants, moltíssimes gràcies a la meva família. Gràcies per recollir-me quan he caigut; gràcies per fer-me costat quan he dubtat; gràcies per alegrar-vos dels meus petits èxits. En definitiva, gràcies pel vostre suport incondicional! Mamà i Papà, no seria qui sóc ni on sóc si no fos per vosaltres. Amb el vostre exemple i esforç he pogut complir cadascun dels meus somnis. Laia, ets la meva germana i la meva amiga. Gràcies per fer el paper de germana “gran” en moltes ocasions. T'estimo molt! Pablo, gracias por querer a mi hermana como laquieres, eres el mejor cuñado del mundo! I els dos, gràcies per portar a la família el Pablo. El seu somriure ha estat indispensable per escriure aquesta tesi.

Finalment, vull agrair a tots aquells que de forma directe o indirecte també m'han ajudat a arribar al final d'aquesta tesi doctoral. Encara que el seu nom no surti de forma explícita i que en algun cas, ni ells mateixos puguin ser conscients, sense ells tampoc hauria estat possible. A tots vosaltres, moltes gràcies!

El presente estudio fue realizado con las ayudas:

- Beca del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) concedida en 2012 con número de registro PI11/01093.
- Ayudas de Investigación Jordi Gras para residentes del Parc de Salut Mar entre Agosto 2011 y Julio 2012.

El presente estudio ha sido presentado en:

- European Surgical Association, como comunicación oral, en Atenas Abril 2014.
- Fundación Asociación Española de Coloproctología, como comunicación oral, en Madrid Mayo 2014.
- European Society of Coloproctology, como poster, en Barcelona Septiembre 2014.
- Asociación Española de Cirujanos, como comunicación oral, en Madrid, Noviembre 2014.

El presente trabajo ha obtenido:

- Premio a la mejor comunicación oral en el congreso de la Fundación Asociación Española de Coloproctología 2014.
- Premio Manuel Corachán (premio a la investigación biomédica) de la *Societat Catalana de Cirurgia*, a la mejor comunicación del curso académico 2013-2014.

Finalmente, el eje central del presente trabajo se ha publicado en la revista *Annals of Surgery* este año 2014.

Postoperative Peritoneal Infection Enhances Migration and Invasion Capacities of Tumor Cells In Vitro

An Insight Into the Association Between Anastomotic Leak and Recurrence After Surgery for Colorectal Cancer

Silvia Salvans, MD,† Xavier Mayol, PhD,† Sandra Alonso, MD, PhD,*† Ramon Messeguer, PhD,‡
Marta Pascual, MD, PhD,*† Sergi Mojal, BSc,§ Luis Grande, MD, PhD,*† and Miguel Pera, MD, PhD*†*

Ann Surg. 2014;260:939-944

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	19
1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal	19
1.2 Características clinicopatológicas, extensión local y diseminación del CCR.....	20
1.3 Tratamiento quirúrgico del cáncer de colon y recto	25
1.4 Recurrencia del cáncer colorrectal.....	27
1.4.1 Factores pronósticos de recurrencia dependientes del tumor.	28
1.4.2 Factores pronósticos de recurrencia dependientes del cirujano y de la agresión quirúrgica.	44
1.4.2.1 Calidad de la cirugía	45
1.4.2.2 Respuesta inflamatoria secundaria a la cirugía.	48
1.4.2.3 Respuesta angiogénica secundaria a la cirugía.	51
1.4.2.4 Complicaciones de la cirugía: asociación entre dehiscencia anastomótica y recurrencia tumoral.....	52
1.4.2.5 Mecanismos implicados entre dehiscencia anastomótica y recurrencia tumoral	54
2 HIPÓTESIS	61
3 OBJETIVOS.....	65
3.1 Objetivos Generales.....	65
3.2 Objetivos Específicos.....	65
4 MATERIAL Y MÉTODOS	69
4.1 Diseño del estudio.....	69
4.2 Sujetos del estudio.....	69
4.2.1 Criterios de inclusión.....	69
4.2.2 Criterios de exclusión.....	69

4.2.3 Grupos de estudio	70
4.3 Técnica quirúrgica	70
4.4 Cuidados perioperatorios	71
4.5 Variables y recogida de datos	72
4.6 Definición de infección peritoneal como complicación postoperatoria: absceso intraabdominal y dehiscencia anastomótica.....	74
4.7 Obtención y análisis de las muestras de sangre y líquido peritoneal	75
4.7.1 Muestras de suero.....	75
4.7.2 Muestras de líquido peritoneal.....	75
4.7.3 Determinación de citoquinas (IL-6 y VEGF) por el ensayo ELISA en muestras de suero.....	75
4.7.4 Arrays de anticuerpos.....	79
4.7.5 Ensayos in vitro	83
4.7.5.1 Líneas celulares	83
4.7.5.2 Mantenimiento de cultivos celulares	84
4.7.5.3 Ensayo de actividad hexosaminidasa	86
4.7.5.4 Puesta a punto del ensayo de actividad de hexosaminidasa	87
4.7.5.5 Preparación de las muestras (suero y líquido peritoneal)	90
4.7.5.6 Diseño de las placas de los ensayos de proliferación, migración e invasión.....	91
4.7.5.7 Ensayo de proliferación celular.....	92
4.7.5.8 Ensayo de migración celular.....	93
4.7.5.9 Ensayo de invasión celular	96
4.8 Análisis estadístico.....	98
4.9 Aspectos éticos	99
4.10 Aspectos de financiación.....	99
5 RESULTADOS	103

5.1 Características de los pacientes, del tumor y resultados perioperatorios.	103
5.2 Resultados de los ensayos ELISA (IL-6 y VEGF)	106
5.2.1 Respuesta inflamatoria sistémica (IL-6)	106
5.2.2 Respuesta angiogénica sistémica (VEGF)	108
5.3 Resultado de arrays de anticuerpos.....	109
5.4 Resultados de los ensayos de proliferación, migración e invasión	111
5.4.1 Ensayo de proliferación en suero.....	112
5.4.2 Ensayo de proliferación en líquido peritoneal	115
5.4.3 Ensayo de migración en suero	118
5.4.4 Ensayo de migración en líquido peritoneal	119
5.4.5 Ensayo de invasión en suero.....	121
5.4.6 Ensayo de invasión en líquido peritoneal.....	122
5.5 Estudio de supervivencia y recurrencia tumoral.....	123
5.5.1 Estudio de supervivencia global y por grupos	124
5.5.2 Estudio de recurrencia global y por grupos	125
5.6 Relación entre variables de los pacientes, del tumor y resultados de los diferentes ensayos con la recurrencia tumoral	127
5.6.1 Variables clínicas de los pacientes	127
5.6.2 Variables anatomopatológicas del tumor	128
5.6.3 Resultados de los ensayos ELISA.....	128
5.6.4 Resultados de los arrays de anticuerpos	129
5.6.5 Resultados de los ensayos in vitro.....	130
6 DISCUSIÓN	135
6.1 Resultados de las variables clínicas de los pacientes, anatomopatológicas del tumor y perioperatorias.	136
6.2 Respuesta inflamatoria y angiogénica a la infección intraabdominal ...	142

6.2.1 Respuesta inflamatoria a la cirugía: influencia de la infección intraabdominal sobre la IL-6	142
6.2.2 Respuesta angiogénica a la cirugía: influencia de la infección intraabdominal sobre el VEGF.....	145
6.2.3 Caracterización extensa de citoquinas implicadas en las respuestas inflamatoria y angiogénica en pacientes con una infección peritoneal postoperatoria: arrays de anticuerpos	147
6.3 Efecto de la infección intraabdominal postoperatoria sobre la actividad de las células tumorales	149
6.3.1 Resultados de proliferación, migración e invasión en suero	149
6.3.2 Resultados de proliferación, migración e invasión en líquido peritoneal	150
6.3.3 Correlación entre la actividad celular in vitro y el patrón de citoquinas inducida por la infección	154
6.4 Asociación entre las variables clínicas, patológicas y el resultado oncológico: el valor de la infección peritoneal postoperatoria.....	155
6.5 Mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal postoperatoria y recurrencia tumoral	166
6.5.1 Efecto de la respuesta inflamatoria y angiogénica.....	166
6.5.2 Efecto de un medio inflamatorio sobre la capacidad de progresión de las células tumorales	172
6.6 Aplicabilidad clínica y futuras líneas de investigación	177
7 CONCLUSIONES	185
8 ANEXOS.....	189
8.1 Información para el paciente	189
8.2 Consentimiento informado	191
9 BIBLIOGRAFÍA	195

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal

La incidencia de cáncer colorrectal (CCR) sigue aumentando en las últimas décadas (1), siendo mayor en hombres que en mujeres. En el año 2012 se detectaron 65,6 nuevos casos de CCR por 100.000 habitantes en hombres y 35,3 en mujeres (2). El CCR es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres españolas (después del cáncer de mama) y el tercero en los hombres (después del cáncer de próstata y pulmón). Según los datos del Instituto Nacional de Estadística, en el año 2012 fallecieron en España 15.604 personas por CCR, lo que representa alrededor de 42 muertes diarias por este tipo de tumor (3). A pesar de que la mortalidad por CCR ha disminuido en España en los últimos años, reduciéndose un 0,2% anual en hombres desde 1998 y un 1,4% anual en mujeres desde 1996 (4), actualmente el CCR ocupa el segundo lugar en defunciones por cáncer en ambos sexos, después del cáncer de pulmón (4).

Las cifras de incidencia y mortalidad por CCR en Europa son semejantes. El CCR es el segundo tipo de cáncer en incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer cuando se analizan ambos性es conjuntamente. La incidencia de CCR ajustada (por 100.000 habitantes) en Europa en 2012 fue de 446,8 casos, ligeramente mayor en hombres (241,6) que en mujeres (205,2). Si se analizan hombres y mujeres por separado, el CCR representa, como sucede en España, la tercera causa de cáncer en hombres (13,2%) después del cáncer de próstata y pulmón, y la segunda causa de cáncer en mujeres (12,7%) después del cáncer de mama. El número estimado de muertes por cáncer en Europa en 2012 fue de 1,75 millones; una de cada 8 defunciones por cáncer fue debida al CCR. Actualmente, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer; en hombres representa un 11,6% (después del cáncer de pulmón) y en mujeres un 13,0% (después del cáncer de mama) (2).

Probablemente, la combinación de una detección precoz del CCR junto con las mejoras diagnósticas y terapéuticas es responsable del aumento de la incidencia y del descenso de la mortalidad de CCR en el mundo occidental (1).

1.2 Características clinicopatológicas, extensión local y diseminación del CCR

La mayoría de los tumores se localizan en el recto (39%) y el sigma (35%), siendo menos frecuentes en colon ascendente (10%), colon transverso (4%), colon descendente (4%), flexura hepática (2%) y flexura esplénica (2%) (figura 1).

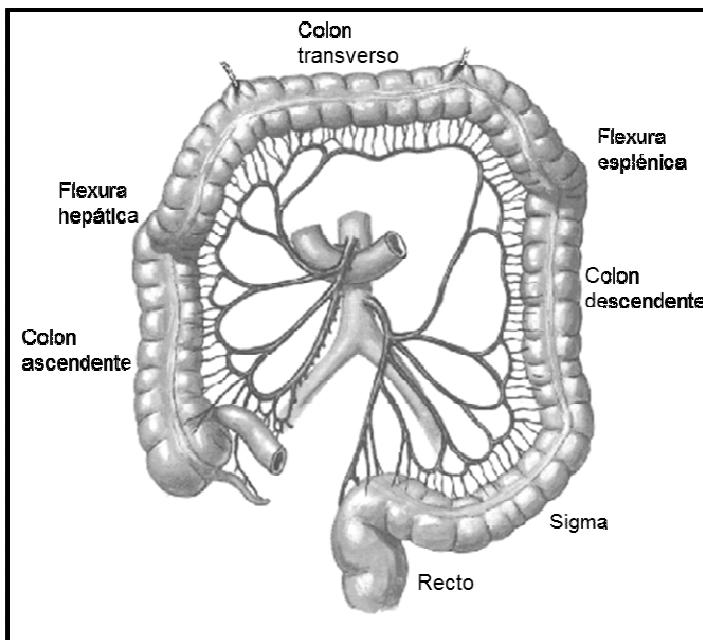


Figura 1. Localización anatómica del tracto inestinal bajo. Adaptada de Netter F.H. (5).

La clasificación histológica de los tumores de colon y recto según la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye tumores epiteliales y no epiteliales. Los adenocarcinomas constituyen alrededor del 85% de los tumores epiteliales de colon y recto. Dentro de este grupo también encontramos el adenocarcinoma mucinoso o coloide que viene definido por la presencia de material extracelular mucoide en más del 50% del tumor. Este tipo histológico representa entre el 10-15% de los tumores de colon y recto (6) y su incidencia es mayor en el mundo occidental. En los últimos años, varios estudios han descrito un aumento de

adenocarcinoma mucinoso en pacientes con CCR tras administración de radioterapia (7). Otros tipos histológicos mucho menos frecuentes son el adenocarcinoma de células en anillo de sella (presenta más del 50% de estas células), carcinoma de célula pequeña (carcinoma neuroendocrino de alto grado), carcinoma escamoso, carcinoma adenoescamoso, carcinoma medular y carcinoma indiferenciado (8).

Según el grado histológico o de diferenciación glandular, los adenocarcinomas se dividen en alto y bajo grado. Los de alto grado vienen definidos por la presencia de menos del 50% de glándulas y son los clasificados antiguamente como pobremente diferenciados e indiferenciados. Cuando más del 50% del tumor está constituido por glándulas se denomina de bajo grado. Los tumores de bajo grado representan más del 80% de los tumores y anteriormente eran definidos como bien y moderadamente diferenciados (9). La estratificación en dos grados ha demostrado una menor variabilidad interobservador y una mayor relevancia pronóstica que la estratificación en cuatro niveles (bien, moderado y pobremente diferenciado e indiferenciado) (9, 10).

El cáncer de colon y recto puede diseminarse a través de varias vías, lo que facilita la progresión de la enfermedad localmente o a distancia.

- Diseminación local intramural: la extensión local del tumor se produce en profundidad a través de las diferentes capas de la pared del colon y en extensión longitudinal de la pared. En el momento del diagnóstico menos del 5% de los tumores están limitados a la mucosa, un 10% aproximadamente alcanzan la capa muscular sin sobrepasarla, mientras que en un 60% de los tumores, la infiltración intramural alcanza la grasa subserosa. Finalmente, un 25% de los tumores han perforado la serosa o invaden órganos adyacentes en el momento del diagnóstico.
- Diseminación transperitoneal: Una vez el tumor invade y traspasa el peritoneo visceral puede desarrollar siembras celulares en la cavidad

peritoneal, afectando el peritoneo visceral y/o parietal. Este desarrollo de metástasis en la cavidad peritoneal se denomina carcinomatosis peritoneal. Casi el 15% de los pacientes con CCR presentan carcinomatosis peritoneal en el momento del diagnóstico (11).

- Diseminación linfática: El CCR puede diseminarse a los ganglios linfáticos a través del drenaje linfático. La diseminación linfática depende en gran medida de la penetración del tumor primario. Alrededor del 10% de los tumores limitados a la mucosa presentan metástasis linfáticas, mientras que aquellos tumores en los que la infiltración alcanza la capa muscular o la sobrepasa, la afectación ganglionar asciende al 25% y 45%, respectivamente.
- Diseminación hematógena: Las células tumorales pueden migrar al torrente sanguíneo e invadir otros órganos. Generalmente, esta diseminación se produce a través de la vena porta, siendo el hígado el órgano dónde más frecuentemente se diagnostican las metástasis (12). Si estas células logran pasar el filtro hepático o afectan directamente a venas que drenan la vena cava podrán causar metástasis en cualquier órgano. Los órganos afectos por metástasis de colon, después del hígado, por orden de frecuencia son: pulmón, tejido óseo y cerebro. Aproximadamente el 20% de los pacientes presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (12, 13).

1.2.1 Clasificación de los tumores en función del grado de extensión: Sistema TNM

El sistema TNM es el método más utilizado para clasificar el grado de extensión local y a distancia de los tumores de colon y recto. Se utiliza no sólo para definir la extensión de la enfermedad, sino también para guiar el algoritmo terapéutico y determinar el pronóstico.

Cada estadio vendrá definido por la combinación de 3 categorías: la extensión en profundidad del tumor (T, *tumor*), la afectación linfática (N, *node* en inglés) y la afectación sistémica (M, *metastasis*). La categoría T de CCR describe la extensión del tumor a través de las capas que forman la pared del colon y recto. La categoría N indica si existe o no propagación de la enfermedad a los ganglios linfáticos regionales; y si lo ha hecho, cuántos ganglios están afectos. Finalmente, la categoría M indica si el tumor se ha propagado a otros órganos como el hígado o ganglios linfáticos distantes. A su vez, cada categoría se subdivide en diferentes niveles representados por números o letras que aparecen después de la T, N y M. Cuando aparece una x significa que esa categoría no puede ser evaluada porque la información no está disponible (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del cáncer colorrectal de acuerdo con la invasión local (categoría T), la afectación linfática (categoría N) y la presencia de metástasis a distancia según la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC)(14, 15).

Categoría T	
Tis	el tumor sólo afecta la mucosa, sin infiltrar la capa muscular de la mucosa (carcinoma in situ)
T1	progresión hasta la capa submucosa, sin infiltrar la muscular propia
T2	infiltración de la capa muscular propia sin sobrepasarla
T3	progresión hasta la subserosa sin infiltrar la serosa
T4a	infiltración de la serosa o peritoneo visceral
T4b	progresión a través de la pared con invasión de tejidos u órganos adyacentes

Categoría N	
N0	no afectación de ganglios linfáticos regionales
N1a	afectación de 1 ganglio linfático regional
N1b	afectación de 2 a 3 ganglios linfáticos regionales
N1c	depósitos tumorales en el tejido pericálico/perirectal, pero no en los ganglios linfáticos en sí
N2a	afectación de 4 a 6 ganglios linfáticos regionales
N2b	afectación de 7 o más ganglios linfáticos regionales

Categoría M	
M0	no propagación del tumor a órganos o ganglios linfáticos a distancia
M1a	propagación a 1 órgano distal o ganglio linfático a distancia
M1b	propagación a más de un órgano distante o carcinomatosis peritoneal

Una vez se han determinado las categorías T, N y M; esta información se combina y se cataloga en diferentes estadios (del 1 al 4) con implicaciones terapéuticas y pronósticas (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación TNM del cáncer colorrectal por estadios (7^a edición) según la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC)(14, 15).

	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1/T2	N0	M0
Estadio II	T3/T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Estadio III	Cualquier T	N+	M0
IIIA	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3/T4a	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M+
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Este sistema de clasificación fue desarrollado y es periódicamente actualizado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union for International Cancer Control (UICC). La última revisión de la clasificación es efectiva desde Enero de 2010(14).

1.3 Tratamiento quirúrgico del cáncer de colon y recto

El tratamiento quirúrgico estándar del cáncer de colon consiste en la resección del segmento de colon afecto por el tumor con los correspondientes ganglios linfáticos situados en el mesocolon que lo acompaña y los vasos sanguíneos que lo irrigan. Se consideran cuatro tipos de intervenciones quirúrgicas según el tumor se localice en el colon ascendente, transverso, descendente o sigma (figura 2). La colectomía derecha incluye la sección proximal de los vasos ileocólicos, cólicos derechos y la rama derecha de los vasos cólicos medios. Si el tumor se localiza en colon transverso se amplía esta sección al origen de los vasos cólicos medios. Si el tumor se encuentra en el colon descendente se realiza una colectomía izquierda. En este caso la sección incluye la ligadura de la arteria mesentérica inferior proximal al origen de la arteria cólica izquierda. Si el tumor se encuentra en sigma la ligadura de la arteria mesentérica inferior se puede realizar distal al origen de la arteria cólica izquierda. Respecto a los tumores localizados en la flexura esplénica existen dos opciones. Algunos cirujanos realizan una colectomía izquierda y otros prefieren una colectomía derecha ampliada practicando una anastomosis ileo-cólica.

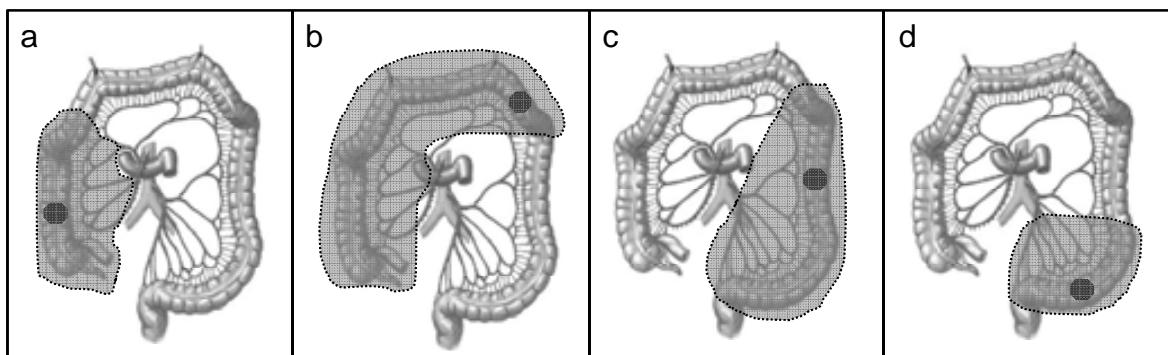


Figura 2. Tipos de resecciones quirúrgicas según la localización del tumor. (a) hemicolec tomía derecha; (b) hemicolec tomía derecha ampliada; (c) hemicolec tomía izquierda; (d) sigmoidectomía. Adaptada de Netter F.H. (5)

Una resección de 5 cm de intestino sano a cada lado del tumor, se considera oncológicamente adecuado para minimizar el riesgo de recurrencia. La mayoría de las veces, este margen quirúrgico es superado debido a la necesidad de incluir

en la resección todo el drenaje linfático del segmento del colon afectado con su correspondiente irrigación. La longitud del ileon terminal resecado en un tumor de colon ascendente no parece influir en la recurrencia local, por lo que se resecará el mínimo ileon distal para prevenir trastornos de malabsorción (16).

Respecto al tratamiento quirúrgico del cáncer de recto, se han introducido cambios importantes en los últimos años, fundamentalmente la escisión total del mesorrecto (ETM). La ETM fue descrita por Heald et al en 1986 (17). Esta técnica consiste en la exéresis del recto conjuntamente con el mesorrecto de alrededor y la fascia mesorrectal que lo envuelve preservando los nervios autónomos de la pelvis. El mesorrecto está constituido por tejido graso que contiene estructuras linfáticas, vasculares y nerviosas, y que rodea el recto de forma circunferencial desde el promontorio sacro para luego descender mientras se estrecha hasta debajo de la fascia de Waldeyer alrededor de los músculos elevadores del ano a nivel del tercio distal del recto. La importancia de realizar una ETM radica en que se incluyen la mayoría de los ganglios de drenaje del tumor así como posibles depósitos tumorales en la grasa (18).

Por otro lado, se ha demostrado la importancia de conseguir un margen circunferencial libre de enfermedad. Un margen circunferencial libre de enfermedad se considera una distancia superior a 1 mm entre el borde del tumor y el margen de resección de la pieza quirúrgica. Los pacientes con margen circunferencial afecto presentan un riesgo de recurrencia local y desarrollo de metástasis mayor (19, 20).

La técnica quirúrgica del cáncer de recto varía en función de la localización del tumor. El recto se divide en tres partes, el recto superior (de 11 a 15 cm del margen anal), medio (de 7 a 11 cm del margen anal) e inferior (de 3-4 a 7 cm del margen anal). En los tumores del recto superior se recomienda un margen distal mínimo de 4 cm (16). En estos casos no es necesaria la ETM sino que es suficiente con la sección parcial del mesorectum. En cambio, para los tumores de recto medio e inferior es necesario realizar una ETM (21). Para los tumores situados hasta 5 cm del margen anal, un margen distal de resección de 1 cm es

oncológicamente aceptable (16). Cuando el tumor afecta el complejo esfinteriano está indicado realizar una amputación abdominoperineal de Miles (22).

Actualmente las resecciones de CCR pueden realizarse por vía laparoscópica. Se ha demostrado que es una vía segura, que ofrece ventajas clínicas en el postoperatorio inmediato sin aumentar la morbilidad a corto plazo comparándolo con la vía abierta tanto en colon (23) como en recto (24). Por otro lado, no hay diferencias en los resultados oncológicos entre ambas técnicas (25, 26). Finalmente, existe interés en la innovación y mejora de la cirugía del CCR, particularmente en el desarrollo de otros abordajes mínimamente invasivos como el abordaje por puerto único (SILS, *Single Incisional Laparoscopic Surgery*), el TAMIS (*TransAnal Minimally Invasive Surgery*), el Transanal NOTES (*Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery*) o la cirugía robótica. Aunque estas nuevas técnicas todavía deben demostrar sus ventajas en estudios aleatorizados incluyendo resultados a corto y largo plazo (26-28), podrían ser especialmente beneficiosas para ciertos subgrupos de pacientes. Por ejemplo, tanto en la publicación del grupo de Atallah en la descripción de los primeros 20 pacientes en los que ha realizado la ETM vía TAMIS, como el grupo de Lacy al publicar sus primeros 20 pacientes tras realizar la ETM vía Transanal NOTES, ambos sugieren que los candidatos ideales para este abordaje serían los varones obesos de pelvis estrecha con un cáncer de recto distal (29, 30).

1.4 Recurrencia del cáncer colorrectal

Después de la resección quirúrgica de un CCR con intención curativa, el factor determinante más importante de supervivencia global es la aparición de recurrencia, ya sea local o a distancia. Ésta puede ocurrir hasta en el 50% de los pacientes(31, 32). A su vez, el factor pronóstico independiente mejor definido para predecir la recurrencia tumoral es el estadio tumoral(32, 33). Pero existen otras variables con valor pronóstico que también influyen en el resultado oncológico como ciertas características anatomo-patológicas del tumor primario, la calidad de

la técnica quirúrgica y la combinación terapéutica con quimioterapia y/o radioterapia.

1.4.1 Factores pronósticos de recurrencia dependientes del tumor.

Se han estudiado múltiples características del tumor primario que pueden influir en el pronóstico de los pacientes con CCR.

1.4.1.1. Localización del tumor

Algunos estudios han analizado el valor pronóstico que podría tener la localización del tumor. La mayoría de ellos, clasifican el colon en dos regiones según su origen embriológico: colon derecho (desde ciego hasta los 2/3 proximales del colon transverso), originado de la rama caudal del intestino medio; y colon izquierdo (desde el tercio distal del colon transverso hasta el colon sigmoide) derivado del intestino posterior embrionario. La base de esta teoría es que los dos orígenes embriológicos podrían dar lugar a tumores con distinto comportamiento y pronóstico según dónde se localicen. Varios estudios concluyen que existe una menor supervivencia en pacientes con tumores del colon derecho (34-36), aunque otros no han encontrado diferencias entre el colon derecho e izquierdo (36-38). Por ejemplo, un estudio realizado en 29.568 pacientes (38) pone en duda la base racional de esta clasificación dado que los tumores de ciego y ángulo esplénico, pertenecientes a grupos de origen embrionario diferentes, presentan características patológicas menos favorables que los tumores de colon ascendente y descendente que también tienen diferentes orígenes. El estudio prospectivo de Jess et al con 23.487 pacientes concluye que los tumores de colon derecho tienen una mayor mortalidad que los del colon izquierdo, aunque al analizar por sublocalizaciones la mortalidad fue mayor en los pacientes con una neoplasia de ángulo esplénico (36). En el estudio de Weiss no se observan diferencias entre colon derecho e izquierdo, pero al estratificar por estadio tumoral, detecta una menor mortalidad en los tumores de colon derecho en el estadio II en comparación a los de colon izquierdo del mismo estadio, pero una mayor mortalidad en tumores de colon derecho en el estadio III (37). Así, al

ajustar por diferentes variables clínicas (edad, sexo, categoría ASA,...) o patológicas (estadio tumoral, tipo histológico o grado de diferenciación celular,...) estas diferencias no se detectaban e incluso, aparecían otras. Estos resultados concuerdan con los de la revisión sistemática de Hansen et al (39), que al realizar el análisis multivariado encuentra que los factores con una influencia directa sobre la supervivencia son la edad, el sexo, el modo de presentación (electivo/urgente), las comorbilidades asociadas y el estadio tumoral, mientras que la localización del tumor por si misma no tiene una clara relación con el pronóstico.

1.4.1.2. Tipo histológico del tumor y grado de diferenciación celular

Los únicos tipos histológicos de CCR que por si mismos tienen mal pronóstico son el adenocarcinoma de células en anillo de sella y el carcinoma de célula pequeña. En una muestra de 119.363 pacientes se detectó una supervivencia a los 5 años significativamente menor en los adenocarcinomas de células en anillo de sella comparándolo con los adenocarcinomas o los adenocarcinomas mucinosos. Incluso esta menor supervivencia se mantuvo al estratificar por estadios a excepción del estadio I donde no se observan diferencias entre los tipos histológicos de CCR. A pesar de ello, los autores son cautos debido a que la prevalencia de adenocarcinoma de células en anillo de sella representaba el 1% de la muestra (40). En otro estudio realizado en 5.817 autopsias de pacientes con tumores de colon y recto, 1.679 presentaban metástasis a distancia; siendo la proporción de éstas significativamente mayor en los adenocarcinomas de células en anillos de sella (61,2%) que en los mucinosos (33,9%) y los adenocarcinomas (27,6%). Además se detectó que las metástasis eran múltiples con mayor frecuencia en los adenocarcinomas con células en anillo de sella y mucinoso que en los adenocarcinomas (41). En cambio, el carcinoma medular y el adenocarcinoma mucinoso asociado a inestabilidad de microsatélites tienen un pronóstico más favorable (10, 42).

Diferentes estudios han demostrado que un tumor de alto grado histológico es un factor independiente de mal pronóstico en cáncer de colon (43) y recto (44). De la misma manera, los tumores histológicamente no formadores de glándulas (por

ejemplo, adenocarcinoma de células en anillo de sella, carcinoma de célula pequeña y el carcinoma indiferenciado) se asignan siempre al grupo de tumores de alto grado, y consecuentemente tienen un peor pronóstico (10).

1.4.1.3. Estadio tumoral

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la clasificación más utilizada sobre el grado de extensión de los tumores de colon y recto es el sistema TNM (14). El estadio tumoral es el factor pronóstico independiente más importante tras el diagnóstico de CCR ya que la supervivencia disminuye a medida que aumenta el estadio (12). En un estudio realizado en 2.720 pacientes procedentes de 11 registros de cáncer europeos en el año 2000 se obtuvo una supervivencia global a los 3 años del 73% en los pacientes con CCR localizado, del 45% en los pacientes con CCR con afectación ganglionar y sólo una supervivencia del 11% en los pacientes con CCR que presentaban metástasis hepáticas sincrónicas al tumor primario (45). Si comparamos los pacientes con CCR localizado con los que presentan enfermedad a distancia, encontramos que el riesgo relativo de fallecer es 14,33 veces (IC95%: 13,34 - 15,40) mayor en un paciente con CCR metastásico respecto a un paciente con CRC localizado (46).

El estadio tumoral del CCR de acuerdo con la última edición del sistema TNM ha supuesto algunas modificaciones con implicaciones pronósticas. En una serie reciente con 1.865 pacientes (47), la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es: Estadio I del 86,3%, Estadio IIa del 79,7%, Estadio IIb del 71,3%, Estadio IIc del 73,8%, Estadio IIIa del 85,4%, Estadio IIIb del 70,3%, Estadio IIIc del 46,9%, Estadio IVa del 15,2% y Estadio IVb del 9,7%.

En cuanto a la categoría T, que viene definida por la invasión de la pared del intestino, los tumores con mejor pronóstico son los carcinomas *in situ* (pTis). Estos tumores aún no han penetrado la membrana basal del epitelio, por lo que no se consideran carcinomas invasivos(10). Por este motivo, estos tumores no producen metástasis. En el otro extremo de la clasificación T encontramos los tumores que invaden el peritoneo visceral por extensión directa a través de la

pared y que pueden invadir órganos adyacentes al colon. Estos son los tumores pT4 que se subdividen, en la séptima edición del sistema TNM en pT4a y pT4b. Los tumores pT4a son aquellos que perforan el peritoneo visceral y pT4b los que invaden órganos o estructuras contiguas. Esta subclasificación de la categoría T4 se debe a la detección de un mejor pronóstico de los pacientes con invasión del peritoneo visceral sin invasión de otros órganos en relación con los que si afectan otros órganos vecinos, tanto en el cáncer de colon (48) como en el de recto (49). Sin embargo, en el estudio de Lan et al no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pT4a y pT4b (47).

Sin enfermedad metastática a distancia, la existencia de ganglios positivos es el mejor factor pronóstico de supervivencia en el CCR. La categoría N también se ha modificado en la séptima edición del sistema TNM. Anteriormente N1 significaba de 1 a 3 ganglios positivos y N2, 4 o más ganglios positivos. En la última edición, y de acuerdo con varios estudios que han demostrado una diferencia en el pronóstico en función de los ganglios afectos, se ha decidido subdividir esta categoría (48, 49). Así, actualmente, N1a significa que existe un solo ganglio positivo, N1b de 2 a 3 ganglios, N2a de 4 a 6 ganglios y N2b 7 o más ganglios afectos.

El cambio más importante es debido a la incorporación del subgrupo N1c. Este grupo incluye los pacientes que presentan depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio o tejido pericólico o perirectal sin ganglios afectos por el tumor. Estos pacientes antes eran catalogados como N0, por lo que les correspondía un estadio II y no recibían tratamiento adyuvante generalmente. Ahora son clasificados como N1, y consecuentemente el estadio pasa a III por lo que reciben tratamiento adyuvante. Además se ha visto que se comportan como N1 en cuanto al pronóstico (47).

La categoría M también se modificó en la última edición. Actualmente se divide en M1a que incluye metástasis a distancia con afectación de un órgano y M1b los pacientes que presentan metástasis a distancia en 2 o más órganos o en la cavidad peritoneal. En el estudio de Lan YT et al (47) no encontraron diferencias en cuanto a la supervivencia al comparar los pacientes en estas nuevas

categorías, M1a (n=240) y M1b (n=181). En la discusión defienden la idea de que la carcinomatosis peritoneal no se debería considerar enfermedad terminal del estadio IV debido a que actualmente existe la posibilidad de tratar estos pacientes (sin otras metástasis) con cirugía citoreductora y quimioterapia hipertérmica intraoperatoria. Así, comparan los pacientes M1a y M1b considerando los pacientes con carcinomatosis peritoneal sin otra evidencia de metástasis a distancia (n=81) en el grupo M1a, como si se tratase de la afectación de 1 sólo órgano, encontrando una mejora de la supervivencia significativa en el grupo M1a.

Debido a la subclasificación de T4 (a y b), M1 (a y b) y el nuevo subgrupo N1c, los estadios se han modificado mínimamente respecto las clasificaciones previas como queda reflejado en el apartado anterior (tabla 2). Esta nueva subclasificación permite una mejor estadificación pronóstica, sobretodo de los pacientes de los grupos IIIB y IIIC, que en el estudio de Lan (47) tienen una supervivencia del 70,3% y 46,9% respectivamente. Sin embargo, al igual que pasaba con la clasificación previa (sexta edición), los pacientes del grupo IIIA tienen un mejor pronóstico que los pacientes IIB y IIC (40, 47).

1.4.1.4. Invasión linfática, venosa y perineural

La invasión de vasos de pequeño calibre también es una característica anatomopatológica de los tumores de colon y recto con valor pronóstico. La invasión vascular, tanto venosa como linfática, presente en un tumor, es un punto clave para el desarrollo de micrometástasis. Los vasos de pequeño calibre de la submucosa aumentan el riesgo de metástasis en los ganglios linfáticos regionales, mientras que los capilares venosos extramurales aumentan el riesgo de metástasis hepáticas (9, 10). La identificación y diferenciación entre la invasión linfática y venosa por parte del patólogo no es fácil. La fibrosis inducida por el tumor y los artefactos producidos por las diferentes técnicas de fijación de la muestra así como la ausencia de una clasificación de referencia para estandarizar su evaluación, hace que exista una variabilidad interobservador nada despreciable (9, 10, 50). De esta manera, en el protocolo de evaluación de una pieza quirúrgica de CCR del *College of American Pathologists* publicado en 2009

se propone el registro de la invasión linfovascular como una única variable (51). Tanto la invasión linfática como la venosa se consideran factores de riesgo independientes de mal pronóstico (9, 10).

La invasión perineural también es un factor independiente de mal pronóstico (10, 52). Se trata de la invasión de células tumorales a través de los nervios perilesionales y está bien establecida como vía de diseminación tumoral. Incluso, la invasión perineural se puede observar en ausencia de invasión venosa o linfática (53). Está presente en hasta el 33% de los tumores de colon y recto. La presencia de invasión perineural se asocia a tumores en estadio avanzado, a un aumento de la recurrencia local y a un descenso de la supervivencia a los 5 años. En un estudio realizado en 124 tumores de colon y recto con ganglios linfáticos negativos (estadio II) los pacientes con invasión perineural presentaron una supervivencia del 57% mientras que los que no tenían invasión perineural la supervivencia aumentó de forma significativa hasta el 87% (54). Este y otros estudios son los que proponen administrar tratamiento adyuvante a los pacientes con estadio II con invasión perineural (53) por el alto riesgo de recurrencia tumoral y reducción de la supervivencia por cáncer y global.

La presencia de invasión linfática, vascular y perineural son factores independientes de mal pronóstico del CCR. En el protocolo de examen de una pieza quirúrgica de CCR del *College of American Pathologists* se recomienda que se valore tanto la invasión linfovascular como la invasión perineural de la siguiente manera: no identificado, presente o indeterminado (51).

1.4.1.5. Respuesta inflamatoria tumoral

Existe una respuesta inflamatoria antitumoral por parte del huésped. Y a su vez, el tumor es capaz de generar una respuesta inflamatoria propia que puede estimular su progresión. Esta respuesta inflamatoria se debe, por un lado, a los cambios celulares secundarios a la necrosis tumoral; y por otro, al daño producido en el tejido peritumoral. Esta respuesta local se manifiesta por la presencia de células inflamatorias en biopsias tumorales (55). Las células inflamatorias o leucocitos

son principalmente macrófagos asociados al tumor (TAM, *Tumor-Associated Macrophages*) derivados de precursores monocíticos circulantes. Cuando los TAM se activan adecuadamente actúan en contra de las células tumorales defendiendo el huésped del tumor. Sin embargo, los TAM también pueden favorecer la diseminación tumoral. En la respuesta inflamatoria tumoral también están implicadas otras células leucocitarias tales como las células dendríticas asociadas al tumor (TADC, *Tumor-Associated Dendritic Cells*) y células T infiltrantes del tumor (TIL, *Tumor-Infiltrating T cells*). Los leucocitos en el microambiente inflamatorio liberarán citoquinas que, por mecanismos autocrinos y paracrinos, perpetuarán esta respuesta inflamatoria en la zona del tumor (55).

Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular que median la comunicación entre células. Éstas son sintetizadas por células inmunológicas y estromales (como fibroblastos y células endoteliales). Las interleuquinas (IL) son citoquinas encargadas específicamente de mediar la comunicación entre leucocitos.

La activación de citoquinas por las células inflamatorias y también por células estromales puede favorecer la progresión tumoral por diferentes mecanismos (figura 3). Pueden inducir cambios celulares, por ejemplo dañan el ADN o inactivan la proteína supresora de tumores p53, hasta transformar células epiteliales sanas en tumorales. Estas nuevas células malignas sintetizan más mediadores inflamatorios, manteniendo el microambiente inflamatorio alrededor del tumor y así favoreciendo la supervivencia y proliferación de estas células tumorales. El tumor crece y compromete la vascularización del tejido perilesional provocando un estrés hipóxico a las células. Por un lado, esta hipoxia intra y peritumoral que resulta en necrosis tumoral seguirá manteniendo la síntesis de citoquinas inflamatorias. Por otro lado, estimulará la síntesis de citoquinas angiogénicas para formar nuevos vasos por los que la nueva masa tumoral podrá nutrirse y oxigenarse, como veremos más adelante. Algunas citoquinas inflamatorias sintetizadas en este ambiente inducen la producción de proteasas que destruirán la matriz extracelular favoreciendo la invasión local del tumor. Otras citoquinas inflamatorias no sólo promueven la supervivencia y proliferación

de células malignas sino que también inducen la expresión de oncogenes que les dará a las células la capacidad de migrar e invadir la membrana basal. Así, la síntesis de citoquinas y sus receptores en el contexto de una respuesta inflamatoria dirigen el movimiento de las células leucocitarias durante la inflamación, pero también de las células transformadas durante la progresión tumoral. De esta manera, durante la transformación celular, muchas de estas células expresan receptores de citoquinas y por lo tanto utilizan estas citoquinas para migrar al torrente linfático y sanguíneo. Las citoquinas favorecen la supervivencia de las células malignas en órganos a distancia, de nuevo atrayendo infiltrados inflamatorios que favorecerán la proliferación de células tumorales y estimularán la angiogénesis; formando las metástasis a distancia (55-59).

En resumen, una vez iniciado el proceso de carcinogénesis, esta inflamación latente secundaria al tumor favorece la supervivencia y proliferación de las células neoplásicas, y estimula la angiogénesis facilitando el crecimiento de la masa tumoral y favoreciendo la capacidad de migración e invasión de las células al torrente linfático y sanguíneo. Ello permitirá la implantación de metástasis a distancia del tumor primario.

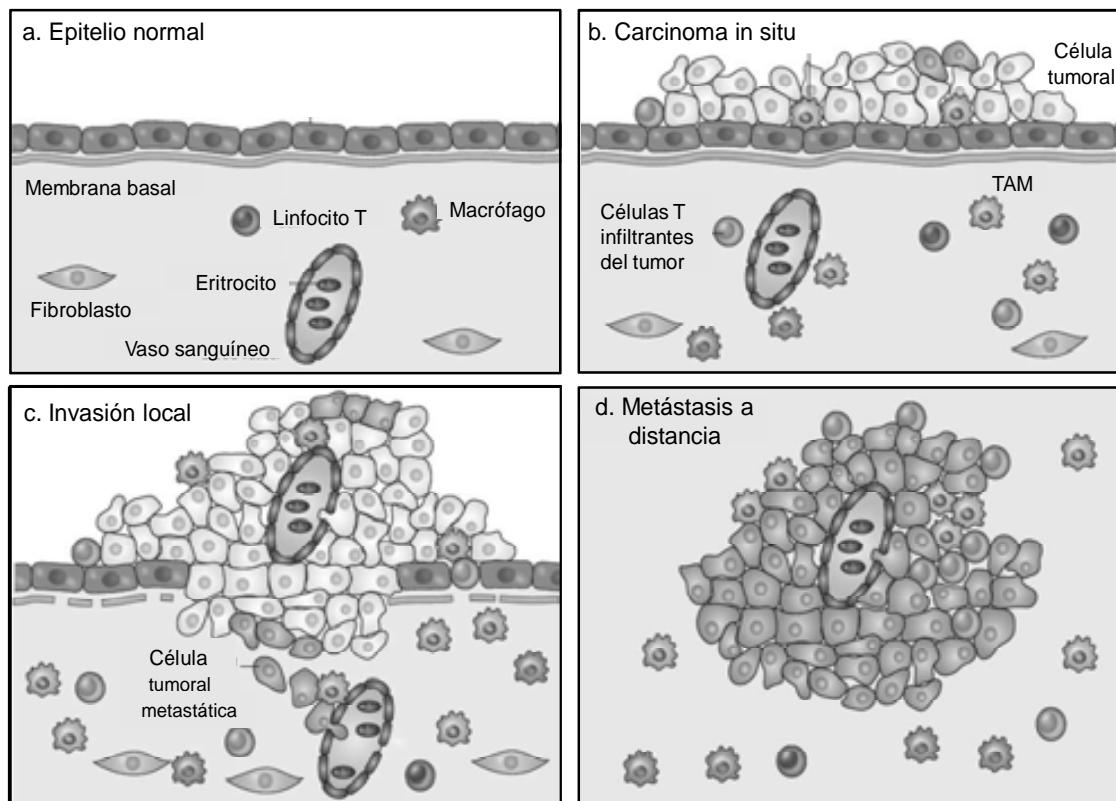


Figura 3. Respuesta inflamatoria y progresión tumoral de un epitelio. **(a)** Epitelio normal (la homeostasis tisular está regulada por citoquinas que actúan por mecanismos autocrinos y paracrinos). **(b)** Carcinoma in situ. Un ambiente inflamatorio podría estimular la carcinogénesis a través, entre otros mecanismos, de la producción de citoquinas por infiltrados promotores de tumores, como por ejemplo, células T infiltrantes del tumor o macrófagos asociados al tumor (TAM). **(c)** Invasión local. La activación de citoquinas por células inflamatorias, estromales y tumorales perpetúa la tumorogénesis; estimulan la supervivencia de células tumorales, promueven la angiogénesis, favorecen la capacidad de migración e invasión a través de la membrana basal, invadiendo vasos sanguíneos y linfáticos. **(d)** Metástasis a distancia. Cuando una célula tumoral alcanza un órgano a distancia, la respuesta inflamatoria tumoral de nuevo se activa para facilitar la supervivencia celular y promover la angiogénesis para formar el nuevo tumor o metástasis. Adaptada de Mantovani et al(56).

Algunos de los ensayos realizados para estudiar el efecto de citoquinas inflamatorias en el comportamiento de células cancerígenas *in vitro*, han consistido en cultivar células tumorales con células mononucleadas de sangre periférica (57). Estas células inmunológicas, sin ningún estímulo, son capaces de sintetizar pequeñas concentraciones de citoquinas inflamatorias. Pero cuando se cultivan con células malignas son capaces de producir mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias y, en menor medida, también anti-inflamatorias. Algunas de las citoquinas se sintetizan en cantidad proporcional al número de células malignas (58). De estos resultados se deduce que existe una alteración

del balance de producción de citoquinas generado por la interacción entre células inmunitarias y células tumorales que apoya el papel de las células malignas en la promoción y mantenimiento de la inflamación como uno de los mecanismos de progresión de los tumores como el cáncer de colon(57, 58). Además, parece que esta producción de citoquinas es mayor a medida que aumenta el grado de malignidad de la célula.

Una de las citoquinas más estudiada e implicada en la respuesta inflamatoria tumoral es la interleuquina 6 (IL-6).

- **Interleuquina 6 (IL-6):**

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria sintetizada por diferentes tipos celulares, como las células T, los macrófagos, las células estromales y las propias células del tumor como respuesta, principalmente, al factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y a la interleuquina 1 (IL-1). La IL-6 modula la función inmunológica mediando una respuesta inflamatoria, local y sistémica, asociada al tumor. La activación de la IL-6 en respuesta a la necrosis tumoral, por diferentes vías metabólicas, favorece la supervivencia y proliferación de células malignas e inhibe su actividad apoptótica. La expresión de IL-6 en las lesiones de colon es paralela a la progresión tumoral, observando valores máximos en lesiones cancerosas de alto grado (59).

Algunos grupos han intentado cuantificar esta respuesta inflamatoria del tumor mediante niveles de proteínas inflamatorias y también angiogénicas; y han estudiado su posible relación con el grado de progresión tumoral. En una revisión sistemática de 2008 se observó que los valores de IL-6 en pacientes con cáncer eran más elevados que en los controles sanos. Los autores concluyeron que existe una asociación entre IL-6 y cáncer aunque no pudieron demostrar un valor diagnóstico (60). Por ejemplo, se ha visto que la necrosis tumoral, independientemente del estadio T del tumor, se asocia a concentraciones elevadas de citoquinas como la IL-6, IL-10 y el VEGF, a una mayor ratio entre

linfocitos y neutrófilos, así como a un mayor conteo de plaquetas, de linfocitos y neutrófilos (61). Posteriormente, se ha detectado que concentraciones elevadas de IL-6 se asocian a una pobre supervivencia en pacientes con cáncer (62). Incluso, se ha propuesto un sistema de puntuación llamado *Glasgow Prognostic Score* que incluye otros dos marcadores de respuesta inflamatoria sistémica. Esta puntuación clasifica a los pacientes según el nivel de proteína C reactiva (PCR) (menor o mayor a 10 mg/dl) y la concentración de albúmina (menor o mayor a 35 g/l). Este estudio concluyó que el *Glasgow Prognosis Score* es un factor predictor de supervivencia independientemente del estadio tumoral en pacientes con CCR operable (63). Esta puntuación ha sido analizada en más de 60 estudios concluyéndose su validez como factor pronóstico independiente del cáncer (64).

1.4.1.6. Angiogénesis tumoral

La formación de nuevos vasos a partir de capilares preexistentes se denomina angiogénesis. Hay un elevado número de enfermedades caracterizadas por alteraciones del proceso angiogénico debidas a su insuficiencia (como por ejemplo, en la esclerodermia o en las úlceras) o a su exceso (como sucede en los procesos neoplásicos) (65). Los vasos sanguíneos son los encargados de aportar oxígeno y nutrientes a las células. Un tejido sin vasos sanguíneos es incapaz de sobrevivir. En el caso de los tumores, sin vasos sanguíneos éstos no podrían crecer más allá de 2-3 mm de diámetro (66) ni metastatizar hacia otros órganos. La angiogénesis es un proceso imprescindible en la progresión tumoral, ya que es la responsable de formar un soporte vascular a las células tumorales permitiéndoles proliferar, migrar e invadir hacia otros órganos.

Existen diferentes vías por las que se forman vasos sanguíneos en el tejido normal y también en el tumoral (figura 4). La creación de vasos nuevos, que generalmente sucede en la fase embrionaria, ocurre por diferenciación de células precursoras (angioblastos) a células endoteliales que posteriormente se diferenciarán en arterias o venas en función de señales específicas. Este es el proceso normal de creación de nuevos vasos denominado vasculogénesis. Las otras vías de formación de vasos son: por expansión de brotes de células

endoteliales (angiogénesis); por división de vasos preexistentes (intususcepción); por secuestro de los vasos por parte de las células tumorales; por reemplazamiento de células endoteliales por células tumorales (mimetismo vascular) o por células madre tumorales que por anomalías citogenéticas en sus cromosomas se transforman en células endoteliales.

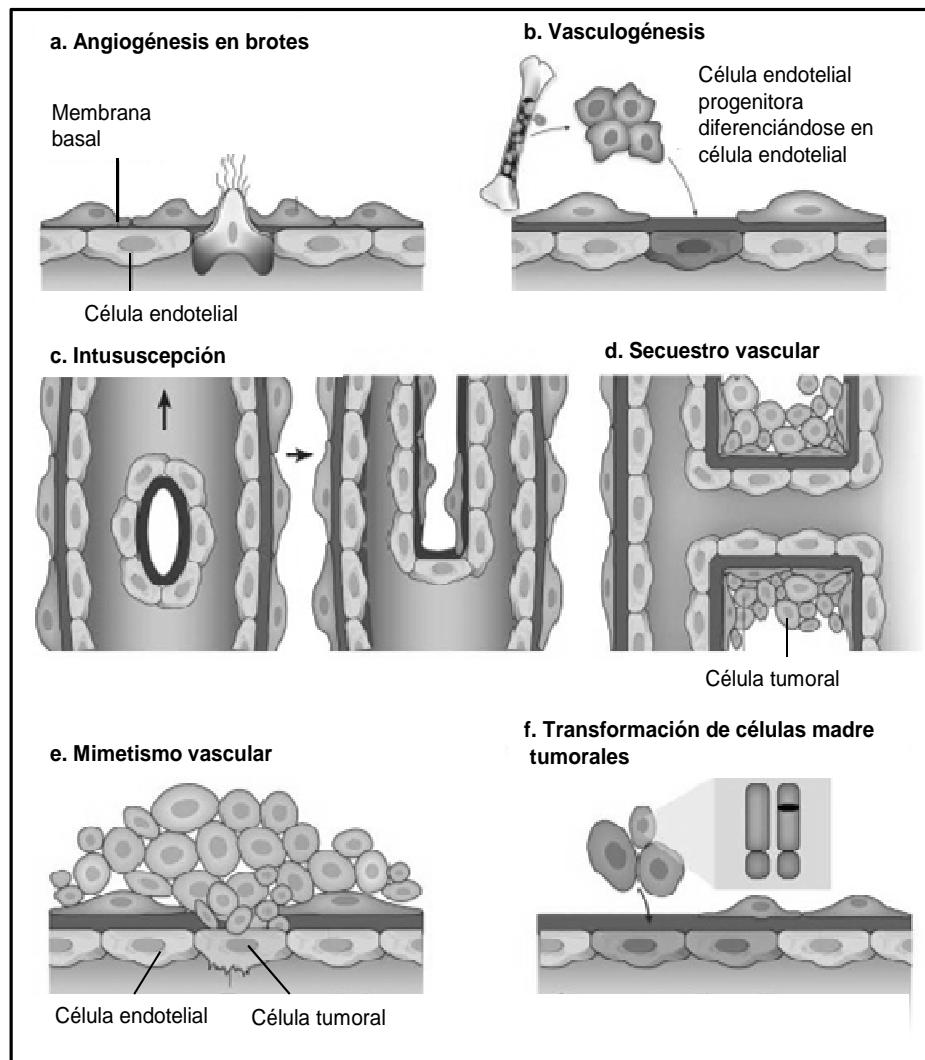


Figura 4: Tipos de formación de vasos en tejido normal (a - c) y tumoral (a - f): (a) Angiogénesis por expansión en brotes de células; (b) Vasculogénesis, diferenciación de células endoteliales progenitoras a células endoteliales; (c) Intususcepción, división de vasos pre-existentes; (d) Secuestro de vasos por parte de las células tumorales; (e) Mimetismo vascular o reemplazamiento de células endoteliales por células tumorales y (f) transformación de células madre tumorales a células endoteliales. Adaptada de Carmeliet et al(67).

En el tejido normal se utiliza la vasculogénesis, la angiogénesis en brotes y la intususcepción para formar vasos; pero los tumores pueden utilizar cualquiera de las 6 vías descritas (67). La formación de vasos en tejidos tumorales también puede ser asistida por el reclutamiento de precursores de células hematopoyéticas que se trasladan desde la médula ósea y/o de células progenitoras endoteliales de la pared vascular (a este proceso se le denomina vasculogénesis postnatal).

El proceso de angiogénesis tiene diferentes fases. Primero se produce una vasodilatación de los vasos preexistentes. Posteriormente aumenta la permeabilidad de estos vasos y hay una extravasación de proteínas plasmáticas. Finalmente hay una invasión de células estromales y activación de células endoteliales que proliferarán y migrarán para formar nuevos vasos a través del tejido tumoral. Al mismo tiempo, se estimulan enzimas proteolíticas (metaloproteasas) que degradan la membrana basal de estos vasos hasta la rotura de la misma (65).

La regulación de la angiogénesis se lleva a cabo mediante un perfecto equilibrio entre la producción y la liberación de diversos factores activadores (proangiogénicos) e inhibidores (antiangiogénicos) que varían en función de las necesidades y del tipo de tejido (68) (tabla 3).

Al igual que la respuesta inflamatoria al tumor, el proceso angiogénico no está producido por una sola molécula, sino que depende de la cooperación e integración de varios factores que pueden ser circulantes o actuar localmente como factores paracrinos. En este proceso participan las células inflamatorias, particularmente las TAM que sintetizan las citoquinas TNF α , IL-1 e IL-6. La IL-6 estimula la angiogénesis a través de la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), permitiendo la invasión vascular de las células tumorales y favoreciendo la capacidad metastática del tumor (60, 62). Los macrófagos también producen TGF- β que tiene una función angiogénica por si misma y a su vez favorecerá la síntesis de

VEGF. Otra citoquina proangiogénica es la IL-8, mientras que la IL-10 es antiangiogénica (55, 69).

Tabla 3: Factores reguladores de la angiogénesis [MMP: degradación de la matriz extracelular; MEC: matriz extracelular; FGF: factores de crecimiento de fibroblastos; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; CE: célula endotelial]. Adaptada de Mauriz et al(65).

Factores proangiogénicos		Factores antiangiogénicos	
Factor	Función biológica	Factor	Función biológica
VEGF	↑permeabilidad, ↑activadores del plasminógeno, ↑colagenasas intersticiales, proliferación y migración de las CE, apoptosis CE	Angiostatina	↓proliferación y migración de las CE, ↓formación tubo vascular, ↑apoptosis CE
FGF	↑proliferación y migración de las CE, ↑activadores del plasminógeno, ↑integrinas $\alpha\beta_3$ y otras moléculas de adhesión	Endostatina	↓proliferación y migración de las CE, ↑apoptosis CE
Ang-1	Formación de brotes vasculares y estabilización de los vasos	Ang-2	Desestabilización de los vasos, ↑apoptosis CE
Ang-2	↑proliferación y migración de las CE, formación de los brotes vasculares en presencia del VEGF	TGF β	↓proliferación y migración de las CE, ↓activadores del plasminógeno, ↑TIMP, ↑apoptosis CE
PDGF	Estabilización de los vasos	TNF α	Inhibición de la proliferación de la CE inducida por el FGF, ↑apoptosis CE
TGF β	Estabilización de los vasos	TSP-1 y TSP-2	↓migración de las CE, ↑apoptosis CE
TNF α	Migración CE	MMP	Generación de angiostatina
EGF	Poliferación CE	PEDF	↓proliferación y migración de las CE
CSFs	Poliferación y migración CE		
Arangiogenina	Poliferación CE		
Angiotropina	Migración CE, formación del tubo		
IGF-1	Poliferación CE, ↓apoptosis CE, inducción del VEGF, ↑activadores del plasminógeno		
HCF	Poliferación y migración CE		
PECAM-1	Agregación CE, formación tubo, migración CE, estabilización tubo, angiogénesis inducida por FGF		
Integrinas	Adhesión CE, migración CE, ↓apoptosis CE, angiogénesis inducida por FGF		
Óxido nítrico	↑permeabilidad, proliferación CE, liberación FGF		

Mientras se mantiene el equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos se entiende que el tumor está quiescente y no crece. A este equilibrio angiogénico se le denomina “interruptor angiogénico” (“angiogenic switch”) (70) (figura 5). Cuando se desequilibra esta balanza hacia la angiogénesis se desencadena todo el proceso que conduce a la formación de nuevos vasos.

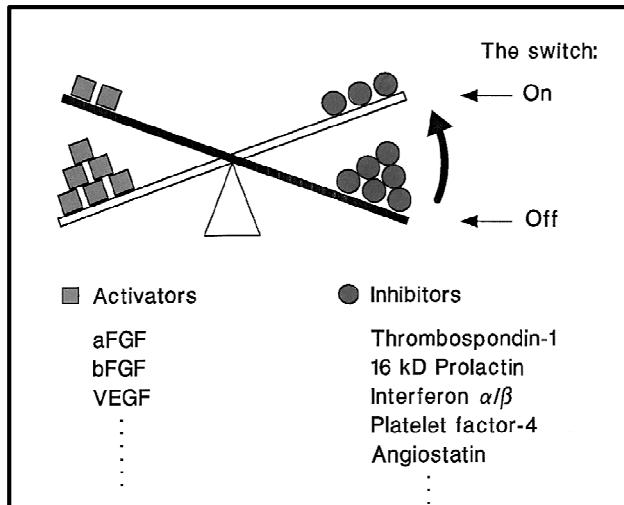


Figura 5: Interruptor angiogénico (*angiogenic switch*, en inglés). El proceso angiogénico puede activarse o inhibirse con la presencia de factores proangiogénicos o antiangiogénicos que accionan el interruptor angiogénico hacia un lado u otro. Adaptada de Hanrahan et al(70).

Son varios los mecanismos que activarán el interruptor angiogénico a través de estos factores. Estos son: mecanismos de estrés metabólico (por ejemplo, la hipoxia, la acidosis o la hipoglucemia), por estrés mecánico (por ejemplo, por la presión generada por la proliferación celular), la respuesta inmunológica o inflamatoria al tumor, o las mutaciones genéticas (por ejemplo, la activación de oncogenes o la inhibición de genes supresores del tumor que amplificaran la expresión de factores proangiogénicos) (68).

- **Factor de crecimiento el endotelio vascular (VEGF):**

El factor estimulador de angiogénesis más estudiado es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*). El VEGF es un potente inductor de la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario (vasculogénesis). Sin embargo, también participa en la formación de nuevos vasos (angiogénesis) en los procesos de inflamación crónica, cicatrización y en la progresión tumoral. Específicamente en los procesos neoplásicos, el VEGF estimula la proliferación y migración de células endoteliales (71); favorece la permeabilidad de los vasos facilitando la extravasación de proteínas plasmáticas y la invasión de células estromales y la movilización de células progenitoras endoteliales de la médula ósea a sitios donde se desarrolla la

neovascularización (72). De esta manera, el VEGF estimula la formación de nuevos vasos que irrigarán el tumor y favorece la diseminación metastásica de las células tumorales. La angiogénesis y su principal mediador, el VEGF, están implicados no sólo en el crecimiento tumoral sino también en su capacidad metastática.

Hasta la fecha se conocen 6 miembros de la familia del VEGF: VEGF-A (que corresponde al comúnmente llamado VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PIGF, *placental growth factor*). El más importante es el VEGF-A que a su vez se subdivide en 6 isoformas en función del número de aminoácidos: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ (65). Todas estas variantes del VEGF se expresan en el CCR, con predominancia del VEGF-A (73). El VEGF realiza su función en las células diana a través de 3 receptores con actividad tirosina quinasa. Éstos son el receptor VEGFR-1 (antes nombrado Flt-1), el VEGFR-3 (KDR/Flt-1) y el más importante en el proceso de angiogénesis, el VEGFR-2 (KDR/Flik-1).

Entre otros biomarcadores de angiogénesis, se han estudiado la densidad vascular intratumoral, la expresión de VEGF intratumoral y la concentración de VEGF en suero y plasma como factores de mal pronóstico en varios tipos de tumores, incluyendo el CCR (74, 75). La mayoría de los estudios muestran una correlación positiva entre una mayor densidad vascular intratumoral con una enfermedad oncológica más avanzada. De esta manera, se ha detectado una mayor densidad vascular tumoral en pacientes con tumores más invasivos(76, 77), en pacientes con ganglios linfáticos positivos en comparación con ganglios negativos (76, 78) y en pacientes con enfermedad metastásica en comparación con pacientes con enfermedad localizada (77). Una mayor densidad vascular tumoral también se ha asociado a un peor pronóstico (76, 77, 79, 80). Incluso se ha estudiado el VEGF intratumoral como variable predictora de respuesta a la radioterapia en pacientes con cáncer de recto, observando valores significativamente mayores de VEGF en las biopsias de cáncer de recto previa a la radioterapia en aquellos pacientes que posteriormente no respondieron comparado con los que respondieron (81). El meta-análisis de Des Guetz

publicado en 2006 observó que la densidad vascular tumoral y el VEGF eran factores de mal pronóstico en el CCR, tanto en supervivencia global como supervivencia libre de enfermedad (82).

Por otro lado, el VEGF en suero es mayor en pacientes con cáncer que en pacientes sanos (79, 83-86). También se ha visto que, al igual que ocurre con la expresión de VEGF intratumoral, los valores séricos de VEGF preoperatorios son mayores al aumentar la profundidad de invasión del tumor así como en los pacientes con ganglios positivos y en los pacientes con enfermedad metastásica (79, 83, 84). Otra evidencia de que los niveles de VEGF son más altos con una enfermedad neoplásica más avanzada es el encontrar valores de VEGF plasmático más elevados en pacientes que se les ha realizado una cirugía paliativa que una cirugía curativa (85). Valores elevados de VEGF preoperatorio se correlacionan con una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (83, 85). Incluso, en algunos estudios el VEGF sérico es factor pronóstico independiente en el CCR (83).

Una prueba de la implicación de la citoquina angiogénica VEGF en la progresión tumoral, es la introducción de fármacos anti-angiogénicos en pacientes con metástasis de CCR. En una revisión de la Cochrane de 2009 se analizan 5 ensayos randomizados, concluyendo que al añadir Bevacizumab al tratamiento quimioterápico en pacientes con metástasis de CCR irrecesables, el periodo de estabilidad de la enfermedad se prolongó de 7,1 meses a 9,7 meses; y la supervivencia global de estos pacientes aumentó de 17,7 meses a 20,5 meses (87).

1.4.2 Factores pronósticos de recurrencia dependientes del cirujano y de la agresión quirúrgica.

Además de todos los factores relacionados con el tumor, existen una serie de factores pronósticos relacionados con la intervención quirúrgica realizada por el cirujano.

1.4.2.1 Calidad de la cirugía

Ya hemos comentado anteriormente, que el número de ganglios afectos por células tumorales es factor independiente de mal pronóstico. Pero también se ha descrito que el número de ganglios resecados tiene valor pronóstico. Se ha publicado que a mayor número de ganglios identificados en la pieza quirúrgica, mejor es la supervivencia (48, 49, 88). Por este motivo, es tan importante realizar una correcta resección oncológica del tumor por parte del cirujano como un adecuado examen histopatológico de la pieza quirúrgica por parte del patólogo. Se asume que un mayor número de ganglios resecados, permitirá una mejor detección de aquellos ganglios afectos por células tumorales. Si existen ganglios positivos no incluidos en la pieza quirúrgica el paciente es infraestadiado y no recibirá el tratamiento adyuvante indicado. Se considera óptima la resección de un mínimo de 12 ganglios en el CCR (16). Recientemente, Li Destri et al (89) han revisado la literatura al respecto del número de ganglios que deben ser resecados con el fin de optimizar el mejor tratamiento oncológico para cada paciente. En dicha revisión, la mayoría de autores están de acuerdo que resecar menos de 12 ganglios reduce la supervivencia del enfermo, pero que resecar más de 12 ganglios no aumenta dicha supervivencia. Éstos realizan un análisis de los factores que pueden influir en la resección de más o menos ganglios como son los dependientes del cirujano y del patólogo. Pero también estudian los factores inmodificables dependientes del paciente (menor exéresis de ganglios en pacientes de edad avanzada, en mujeres y en obesos) y del tumor, como es su localización, estadio y pacientes que han recibido tratamiento preoperatorio (por ejemplo, en el cáncer de recto tratado con neoadyuvancia el número de ganglios suele ser inferior a 12) (6). Por ello, se ha propuesto el ratio de ganglios linfáticos (que sería los ganglios afectos respecto los identificados) como variable con mejor valor pronóstico y analizan el valor que podría añadir la detección del ganglio centinela que hasta la fecha es incierto.

En el cáncer de recto tan importante como el estadio tumoral es una correcta ETM y un margen circunferencial libre. Actualmente, la ETM (17) es la técnica

quirúrgica de elección en un tumor de recto. La ETM se ha convertido en un factor predictor independiente de supervivencia global (90, 91) en estos pacientes. En un estudio que incluía 1.411 pacientes de 3 centros hospitalarios diferentes que se agruparon en dos grupos en función de si se había realizado o no la ETM, se observó una mayor supervivencia global y relacionada con el cáncer y una menor recurrencia local en el grupo de pacientes donde realizaron la ETM (92). La apertura de la fascia que envuelve el mesorrecto durante la intervención quirúrgica o la afectación del margen de resección favorece la diseminación local de células neoplásicas, especialmente en pacientes con tumores que infiltran extensamente la grasa perirrectal.

La afectación del margen circunferencial también se asocia a un peor pronóstico en cuanto a supervivencia y a un aumento de la recurrencia local y también a distancia (19, 20, 33, 93). Incluso cuando la ETM es correcta, la afectación del margen circunferencial disminuye la supervivencia libre de enfermedad y se asocia a mayor mortalidad relacionada con el cáncer (94).

Durante la intervención quirúrgica, aproximadamente un 15% de los tumores de recto están adheridos a órganos adyacentes. De éstos, entre el 49 y 84% tendrán confirmación histológica (estadio T4b). Así, se debe realizar una disección en bloque del tumor con las estructuras afectas dado que es muy difícil discernir entre infiltración tumoral y reacción inflamatoria antes o durante la cirugía(16, 18). De la misma manera que la afectación del margen circunferencial o la ETM incompleta condiciona unos peores resultados oncológicos, también se ha descrito que la perforación del recto durante la cirugía se asocia a un aumento de la recurrencia local y a una disminución de la supervivencia a los 5 años (16, 95). Esta complicación se ha descrito entre un 8% y un 26% de los pacientes intervenidos de cáncer de recto (16).

De forma análoga a las mejoras en los resultados oncológicos conseguidos tras la introducción de la ETM en el cáncer de recto, algunos expertos proponen la exéresis completa del mesocolon (ECM) para el cáncer de colon. Estos proponen una exéresis más extensa del mesenterio del colon por el plano anatómico con el

objetivo de disminuir la recurrencia y aumentar la supervivencia de estos enfermos. Esta técnica consiste en la disección entre el plano embriológico de la fascia visceral del mesocolon y la fascia parietal del retroperitoneo para conseguir la exéresis íntegra del mesenterio del colon que contiene los ganglios linfáticos intermedios dónde drena el tumor. También incluye la ligadura en el origen de los vasos que irrigan el tumor con la intención de resecar los ganglios linfáticos centrales en una dirección vertical así como la resección de la longitud adecuada del intestino que incluirá los ganglios linfáticos pericólicos en una dirección longitudinal siguiendo el recorrido de la arteria marginal (96). West et al comparan la ECM con la técnica standard encontrando una resección de casi el doble de ganglios linfáticos en el grupo de la ECM (30 vs. 18; P<0,0001) a expensas de ganglios linfáticos negativos; es decir, no encontró diferencias significativas en los ganglios linfáticos positivos resecados entre los grupos. En el mismo estudio analizan la resección en el plano de disección del mesocolon siendo significativamente mejor en el grupo de la ECM y observando una mayor exéresis de tejido en este grupo. Los autores no analizan la morbilidad ni mortalidad entre grupos así como los resultados oncológicos a largo plazo (97). Hohenberger et al realizan un estudio prospectivo en 1.329 pacientes y detectan una disminución significativa de la recurrencia local y un aumento de la supervivencia relacionada con el cáncer a los 5 años significativamente mayor en los pacientes que se les realizó una ECM (98). Una revisión sistemática reciente (99) que incluye 21 estudios no encuentra evidencia suficiente para recomendar la ECM como técnica estándar para el tratamiento del cáncer de colon. Por un lado, no encuentra diferencias significativas en la morbilidad ni mortalidad entre las técnicas. Y aunque la recurrencia local, la supervivencia relacionada con el cáncer a los 5 años y la supervivencia global fue mejor en el grupo ECM, los autores enumeran las limitaciones de la revisión que impiden dar resultados de forma contundente. Estas limitaciones son la inclusión de sólo series de casos prospectivos y retrospectivos, la heterogeneidad entre los estudios, la falta de análisis de variables y la existencia de sólo 5 estudios que tenían un grupo control. Además los autores insisten en la necesidad de valorar los resultados funcionales y la calidad de vida de estos pacientes tras una resección extensa de colon.

Teniendo en cuenta las implicaciones de una correcta exéresis del tumor por parte del cirujano en la supervivencia del enfermo, es de vital importancia la especialización de cirujanos entrenados en esta técnica quirúrgica. Se ha observado un descenso de las complicaciones postoperatorias incluyendo la dehiscencia anastomótica y una reducción de la recurrencia local a medida que aumenta la experiencia del cirujano (100). También se han obtenido mejores resultados oncológicos en las instituciones con un volumen mayor de pacientes (101). La cirugía debe ser R0 (resección en bloque del tumor con márgenes negativos). La resección R1 (márgenes histológicamente positivos) o R2 (tumor macroscópico residual) aumentan la recurrencia local y disminuyen la supervivencia (16, 18).

1.4.2.2 Respuesta inflamatoria secundaria a la cirugía.

La respuesta inflamatoria aguda que se produce por el traumatismo quirúrgico es beneficiosa para la eliminación de posibles agentes patógenos y para activar los procesos de cicatrización de los tejidos (102). Esta respuesta principalmente es local, aunque en función del grado de agresión también habrá una respuesta sistémica. Se inicia rápidamente con la producción de citoquinas quimiotácticas que atraerán en minutos neutrófilos y macrófagos, entre otras células, a la zona quirúrgica. Estas células serán las encargadas de realizar funciones de fagocitosis y apoptosis. Por otro lado, seguirán secretando más citoquinas para atraer al foco traumático otras células que inicien el proceso de cicatrización tisular (103, 104). La citoquina más importante implicada en este proceso es la IL-6 que actuará a través de mecanismos autocrinos y paracrinos.

La concentración de IL-6 peritoneal tras cirugía de CCR presenta un pico a las 6 horas de la agresión quirúrgica. Posteriormente, sus niveles descienden hasta alcanzar niveles preoperatorios a las 48-72 horas, si no existe un estímulo que perpetúe la respuesta inflamatoria (102, 105, 106). Por ello se considera que la IL-6 es un marcador precoz de daño tisular secundario a la agresión quirúrgica. Se han detectado valores superiores de IL-6 peritoneal tras cirugía de recto respecto

a la cirugía del colon, pero estos no han alcanzado la significación estadística (107).

Paralelamente a lo que sucede a nivel local, en el suero también se detecta un pico de IL-6 a las 6 horas que posteriormente descenderá. Sin embargo, la concentración de IL-6 es mucho menor en el suero que en el líquido peritoneal (108, 109), quizás debido a que la respuesta inflamatoria se origina en la cavidad peritoneal. En un estudio realizado por nuestro grupo, observamos que la concentración de citoquinas proinflamatorias en el líquido peritoneal alcanzó niveles entre 50 y 200 veces más elevados en suero, lo que sugiere que la respuesta sistémica a la cirugía es sólo un reflejo menor de lo que ocurre a nivel local, en el foco traumático (109).

La concentración de IL-6 en suero es proporcional a la intensidad del traumatismo quirúrgico. Por ejemplo, se han detectado valores de IL-6 mayores en pacientes intervenidos de cirugía de aorta que en pacientes intervenidos de hernia inguinal (105, 110). De la misma forma, se han descrito niveles de IL-6 inferiores en los pacientes intervenidos por laparoscopia respecto a los operados por laparotomía (111). Nuestro grupo también ha estudiado la respuesta inflamatoria en un modelo animal de cáncer de colon confirmando que los valores séricos de IL-6 alcanzan un pico máximo 6 horas después de la intervención quirúrgica tanto en el grupo de cirugía abierta como en el de cirugía laparoscópica. Cuando se compararon los valores de IL-6 entre los dos grupos, se observó que fueron significativamente más elevados en el grupo de cirugía abierta (112). Posteriormente hemos confirmado también estas diferencias en la respuesta inflamatoria postoperatoria entre cirugía abierta y laparoscópica en un ensayo clínico aleatorizado (109).

Se ha estudiado la IL-6 en líquido peritoneal, entre otras citoquinas, como factor predictivo de complicaciones postquirúrgicas. En el estudio de Zhu et al detectaron valores de IL-1 β , IL-6 y TNF α en líquido peritoneal al 5º día postoperatorio significativamente más elevados en pacientes que presentaron un íleo paralítico postoperatorio respecto los pacientes que no presentaron ninguna complicación. Incluso se observó que los valores de las 3 citoquinas inflamatorias

al 1r, 3r y 5º día postoperatorio aumentaban de forma significativa en los pacientes que posteriormente presentaron un íleo mientras los otros disminuían los niveles (113). También se han detectado valores más altos de otras citoquinas en suero de pacientes que han presentado una sepsis intrabdominal tras cirugía de CCR respecto a los pacientes que no presentaron ninguna complicación (114). Incluso se han detectado valores de IL-6 tres veces más elevados en el primer día del postoperatorio (antes del diagnóstico de la infección peritoneal secundaria a la dehiscencia de anastomosis) en los pacientes que han presentado esta complicación respecto a los que no presentaron ninguna complicación (106, 115). Por este motivo, algunos consideran que la detección de IL-6 elevada a las 72 horas de la cirugía podría ser un marcador precoz de complicación postoperatoria como la dehiscencia anastomótica.

El valor pronóstico oncológico de proteínas que participan en la respuesta inflamatoria postquirúrgica en pacientes con CCR ha sido escasamente estudiado. Por ejemplo, un estudio prospectivo encuentra que valores elevados de proteína C reactiva a los 4 meses de la cirugía de CCR curativa se asocian a una mayor recurrencia tumoral que los pacientes con valores bajos (116). No hemos encontrado ninguna publicación que estudie específicamente el valor pronóstico de la IL-6 postoperatoria. Los niveles de IL-6 en suero preoperatorio si han sido estudiados y se ha observado su valor pronóstico en los pacientes con CCR. Los pacientes con valores elevados de IL-6 preoperatorios presentan una supervivencia menor que los pacientes con valores de IL-6 bajos (117).

En resumen, la IL-6 es un marcador de daño tisular. La cirugía induce una respuesta de IL-6 local y sistémica relacionada con la magnitud de la operación. Una respuesta amplificada y prolongada de IL-6 se asocia al desarrollo de complicaciones tras la cirugía (102, 106, 110, 113, 115) y además parece tener un valor pronóstico en los pacientes con cáncer (117).

1.4.2.3 Respuesta angiogénica secundaria a la cirugía.

La angiogénesis también está implicada en procesos biológicos tales como la regeneración hepática, el ciclo menstrual y la cicatrización de las heridas (imprescindible tras una intervención quirúrgica). Por este motivo el comportamiento de VEGF tras una intervención quirúrgica también se ha estudiado, aunque menos que las variaciones de IL-6.

Después de una agresión quirúrgica, las citoquinas son sintetizadas y liberadas a la zona del insulto antes de ser secretadas sistémicamente, por lo que no es de extrañar obtener valores de VEGF peritoneal mucho más elevados que los obtenidos en suero, tal y como ocurre con la IL-6.

El comportamiento de la citoquina VEGF en suero o plasma es parecido al de la IL-6. El VEGF alcanza una concentración pico a las 6h tras la incisión cutánea y, en este caso, desciende de forma más lenta que la IL-6, perdurando la respuesta unos pocos días (86, 109, 118). Al igual que sucedía con la IL-6, el estímulo de VEGF parece proporcional a la magnitud de la agresión quirúrgica, encontrando valores más elevados tras cirugía mayor, como la cirugía de aneurisma de aorta, que en cirugía menor, como es una tonsilectomía (118). En cambio no parece tan clara la mayor síntesis de VEGF en cirugía abierta que en laparoscópica, encontrando resultados contradictorios en la literatura (86, 109). Nuestro grupo si que ha demostrado valores más elevados de IL-6 y VEGF en suero de ratones después de una laparotomía media respecto un abordaje laparoscópico (112). Posteriormente, en nuestro ensayo clínico aleatorizado en pacientes intervenidos de CCR (109) confirmamos que existe una mayor expresión de VEGF después de cirugía abierta en comparación con la cirugía laparoscópica.

Análogamente a lo observado con la IL-6, parece que el VEGF también tiene un valor predictivo de aparición de complicaciones postoperatorias así como un valor pronóstico sobre el resultado oncológico. Los valores de VEGF en el postoperatorio de pacientes que presentan una complicación son

significativamente más elevados que los pacientes que cursan con un postoperatorio normal (114).

Por otro lado, en nuestra línea de investigación hemos observado que la concentración de VEGF en suero durante el periodo postoperatorio inmediato era significativamente mayor en aquellos que posteriormente presentaron una recurrencia tumoral, tanto en nuestro modelo animal (112) como en el ensayo clínico (109). La concentración de VEGF sérica en los primeros días del postoperatorio fue factor pronóstico independiente de recurrencia junto con la afectación ganglionar (109).

En resumen, la agresión quirúrgica es responsable de una respuesta angiogénica que participará en los procesos de cicatrización y reparación de los tejidos. Esta respuesta es proporcional a la magnitud de la cirugía, y es mayor a nivel local que sistémico. Además, una concentración elevada de VEGF en el postoperatorio inmediato tiene valor predictivo de complicaciones postquirúrgicas y se asocian a un peor resultado oncológico.

1.4.2.4 Complicaciones de la cirugía: asociación entre dehiscencia anastomótica y recurrencia tumoral

El paradigma de complicación séptica después de la resección de CCR es, sin duda, la dehiscencia anastomótica. La incidencia varía entre un 2% y un 15% dependiendo de la definición de dehiscencia de anastomosis y de la localización del tumor, siendo más frecuente tras la cirugía del cáncer de recto (119-123). Esta complicación se asocia a una elevada morbilidad y en consecuencia una mayor estancia hospitalaria. En un estudio sobre 28.271 pacientes intervenidos de cáncer de colon, se detectó una morbilidad postoperatoria del 62,7% en los pacientes que presentaron una dehiscencia anastomótica con una estancia hospitalaria 2,3 veces mayor que los pacientes que no presentaron esta complicación. La dehiscencia anastomótica también tiene una mortalidad asociada nada despreciable. En el mismo estudio detectaron una mortalidad del

18,6% en los pacientes que habían presentado una dehiscencia frente al 2,6% en los pacientes que no la presentaron (124). La mortalidad asociada a esta complicación es mayor tras la resección de un cáncer de colon en comparación con la resección de recto (26,3% vs. 2,5%) (119). En el meta-análisis de Snijders et al (122) en pacientes intervenidos de cáncer de recto concluyeron que la dehiscencia anastomótica es responsable directa de un tercio de las muertes postoperatorias.

Numerosos estudios publicados en los últimos años sugieren que la dehiscencia de anastomosis se asocia a un peor resultado oncológico (119, 120, 123-128). En dichos estudios se ha observado una asociación entre la dehiscencia y una mayor tasa de recurrencia del tumor y mortalidad específica por cáncer así como una menor supervivencia.

McArdle et al (127), en una serie de 2.235 pacientes operados de cáncer de colon y recto observaron un descenso significativo de la supervivencia global a los 5 años del 55,1% al 42% ($P=0,009$) y de la supervivencia relacionada con el cáncer del 68% al 50% ($P<0,001$). Los autores concluyeron que la dehiscencia de anastomosis es un factor independiente asociado a una menor supervivencia global y relacionada con el cáncer en el análisis multivariado. Walker et al (123), en una serie de 1.722 pacientes con CCR, observaron que la razón de riesgo de los pacientes con infección peritoneal postoperatoria respecto los que no presentaron esta complicación en la supervivencia relacionada con el cáncer era de 1,8 (IC del 95%: 1,3-2,6; $P<0,05$); es decir, el riesgo de morir de cáncer tras sufrir una infección peritoneal es casi el doble respecto los pacientes que no han presentado esta complicación después de cirugía de CCR.

Ptok et al (128) encontraron que los pacientes con dehiscencia anastomótica tras cirugía de cáncer de recto que requirieron una reintervención tenían una tasa de recidiva local a los 5 años superior y una menor supervivencia libre de enfermedad que los pacientes sin dehiscencia. Es interesante señalar como en este estudio, la dehiscencia de anastomosis que se resolvió con tratamiento conservador no tuvo un efecto independiente sobre la recurrencia.

En el estudio de Law et al (119) la recurrencia a los 5 años en pacientes con y sin dehiscencia anastomótica fue del 53,8% y 27,2% respectivamente. El porcentaje de ambas formas de recurrencia, local y sistémica, fue significativamente mayor en aquellos pacientes que presentaron una dehiscencia. El análisis multivariado mostró que la dehiscencia era un factor independiente asociado a la recurrencia sistémica (razón de riesgo 1,94; IC 95%: 1,23-3,06; P=0,004) para todos los pacientes, mientras que fue un factor independiente asociado a la recurrencia local sólo en el subgrupo de pacientes con cáncer de recto (razón de riesgo: 2,55; IC 95%: 1,07-6,06; P=0,034). Los mismos resultados obtienen Bell et al (125) en una muestra de 403 pacientes operados de cáncer de recto dónde también encuentran que la dehiscencia anastomótica es un factor de riesgo independiente de recurrencia local. Más recientemente, Katoh et al (126) analizaron específicamente el riesgo de recurrencia sistémica relacionada con la dehiscencia en una serie de 207 pacientes con CCR. La razón de riesgo de los pacientes con infección peritoneal en comparación con los que no la presentaron fue de 4,38 (IC95%: 1,66-11,58; P=0,003), lo que indicaba que la infección peritoneal aumentaba el riesgo de recurrencia y muerte por cáncer en un factor de 4 o más. Aunque la asociación entre dehiscencia de anastomosis y aumento de la recurrencia tumoral y mortalidad por cáncer ha sido cuestionada por algunos autores (129-131), el meta-ánalisis de Mirnezami et al (120) sobre un total de 21.902 pacientes incluidos en 21 estudios concluyó que la dehiscencia de anastomosis tiene un impacto negativo en el resultado oncológico de los pacientes operados de CCR.

1.4.2.5 Mecanismos implicados entre dehiscencia anastomótica y recurrencia tumoral

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la asociación entre dehiscencia de anastomosis, infección peritoneal postoperatoria y la recurrencia del tumor.

Varios estudios han demostrado la presencia de células tumorales residuales tras la resección quirúrgica de CCR con intención curativa en la línea de grapas tras

una anastomosis mecánica (132, 133) y en la luz intestinal (134, 135). Se ha sugerido que la dehiscencia podría favorecer la implantación de estas células tumorales exfoliadas que serían depositadas en la pelvis fuera de la luz intestinal (136). Este comportamiento sería equiparable a la perforación inadvertida de un tumor de recto durante la exéresis quirúrgica, que conlleva un peor pronóstico de supervivencia y eleva la incidencia de recurrencia local (16, 95).

Otro de los mecanismos que se han sugerido es que la inflamación postoperatoria podría inhibir la apoptosis de las células tumorales (123). Sin embargo, estas hipótesis no se han demostrado, y deben estudiarse otros factores implicados en el crecimiento del tumor.

Como se ha comentado, la cirugía induce no sólo una respuesta inflamatoria sino también una respuesta angiogénica que son proporcionales al traumatismo quirúrgico (109, 112). La inflamación y angiogénesis postoperatorias forman parte del proceso de curación de las heridas pero también son factores que pueden ser aprovechados por las células tumorales residuales para su supervivencia y progresión, por lo que podrían favorecer la recurrencia tumoral. Nuestro grupo ha demostrado en un modelo animal de cáncer de colon que la concentración postoperatoria en suero de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 se correlaciona con la concentración en suero de VEGF, la principal citoquina angiogénica. En ese estudio preclínico, la recurrencia tumoral se asoció a concentraciones más elevadas de IL-6 y de VEGF (112). Hemos demostrado también en un modelo experimental de cáncer de colon que los ratones a los que se les inducía una infección peritoneal tras la resección del tumor presentaban una mayor expresión de VEGF y una mayor recurrencia tumoral en comparación con los ratones a los que no se les inducía la infección (137). Más recientemente, hemos confirmado los mismos resultados en un estudio clínico de cohortes con controles apareados en el que la recurrencia tumoral sistémica fue significativamente mayor en pacientes con cáncer de colon en estadio II y III que presentaron una infección intraabdominal en el postoperatorio en comparación con pacientes que siguieron un curso postoperatorio sin complicaciones. La concentración en suero y en líquido peritoneal de IL-6 y de VEGF fue significativamente mayor en los

pacientes que presentaron una infección intraabdominal postoperatoria y se asoció a un mayor riesgo de recurrencia tumoral (138). Por ello, se propone que la infección peritoneal postoperatoria amplifica las respuestas inflamatoria y angiogénica, hecho que podría favorecer la progresión de células tumorales viables en el lecho quirúrgico (139, 140) y también el crecimiento de micrometástasis. En este sentido, hay que señalar que se han aislado células tumorales en sangre periférica de pacientes con enfermedad no metastatizada (141, 142). La revisión de Akagi et al (143) incluye 13 estudios donde se detectan tasas de células tumorales en sangre periférica entre el 22 y el 62% en pacientes con CCR sin metástasis (estadio I, II y III). Además, 12 de los 13 estudios encontraron diferencias significativas en recurrencia y mortalidad en los pacientes que tenían células tumorales en sangre periférica. Algunos pacientes presentan además metástasis hepáticas ocultas en el momento de la resección quirúrgica del tumor primario (144, 145). Estas micrometástasis en órganos a distancia quiescentes o dormidas podrían progresar con el estímulo de una respuesta inflamatoria sistémica y angiogénica magnificada y prolongada. De estos estudios se puede deducir que algunos pacientes con CCR localizado presentan células tumorales residuales a nivel local pero también a nivel sistémico después de la intervención quirúrgica.

Además de un incremento en la concentración en suero y líquido peritoneal de IL-6 y VEGF en pacientes que presentan una dehiscencia de anastomosis, es necesario identificar otras citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria y angiogénica que puedan servir como biomarcadores de recurrencia y quizás como nuevas dianas terapéuticas.

Por otro lado, otros factores relacionados con el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis pueden estar implicados en la asociación entre la infección peritoneal postoperatoria y la recurrencia del CCR. El objetivo de nuestro grupo es estudiar si el incremento de la respuesta inflamatoria induce un cambio en la actividad de células tumorales *in vitro*, lo que podría explicar su influencia en células tumorales residuales *in vivo*, aportándoles una mayor capacidad de progresión tumoral. En concreto, el siguiente paso de nuestra línea

de investigación es estudiar la capacidad de proliferación, migración e invasión de líneas tumorales al ser tratadas con sueros y líquidos peritoneales de pacientes que han sufrido una infección intraabdominal secundaria a una dehiscencia anastomótica y compararlo con el comportamiento de las células tumorales al aplicarles muestras de pacientes que no presentaron una complicación. Este podría ser otro mecanismo por el cual se explicaría la asociación entre dehiscencia anastomótica y recurrencia local.

En este sentido nuestro grupo de investigación, tiene experiencia en un modelo *in vitro* de interacción entre células inflamatorias y células tumorales, el cual mimetiza, al menos en parte, situaciones fisiológicas como el microambiente inflamatorio que se encuentra en ciertos tumores o la respuesta inflamatoria a la que pueden verse sometidas células tumorales residuales después de una infección peritoneal postoperatoria. Este modelo está basado en la línea celular THP1 derivada de un linfoma monocitario humano (146). Las células THP1 muestran un fenotipo monocítico y cuando son sometidas a ciertos tratamientos (lipopolisacáridos, éster de forbol, PMA -forbol 12-miristato 13-acetato-) se diferencian morfológicamente a macrófagos pasando a secretar citoquinas y factores extracelulares propios de una respuesta inflamatoria (TNF α , IL-6 e IL-8). Utilizando medios condicionados por cultivos THP1 diferenciados (medio inflamatorio), hemos hallado que mientras que algunas líneas de colon sufren un proceso de muerte celular por apoptosis al ser tratadas con el medio inflamatorio, otras líneas sobreviven al tratamiento. Es decir, no sólo observamos células de cáncer de colon que son resistentes a los efectos citotóxicos del medio inflamatorio, sino que además estas células muestran una respuesta adaptativa a este medio que podría favorecer su supervivencia y diseminación en los tejidos. En particular, el tratamiento de la línea celular tumoral HT-29 con medio inflamatorio induce un fenotipo de scattering *in vitro* (pérdida de características epiteliales incluyendo una pobre adhesión intercelular) asociado a un incremento de la movilidad celular en ensayos de reparación de heridas sobre monocapas celulares (figura 6).

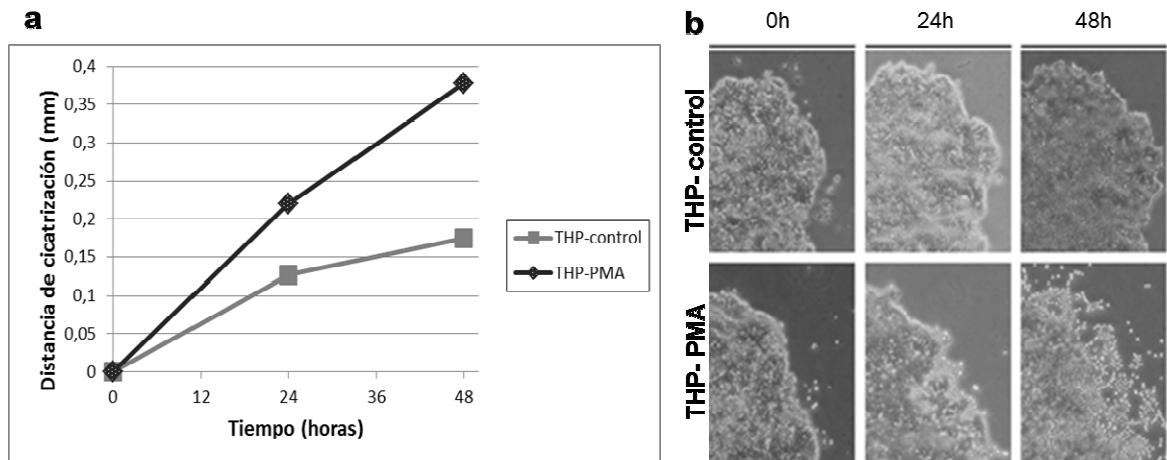


Figura 6: Experimento de reparación de heridas en cultivos de la línea celular de cáncer de colon HT-29 sometida a tratamiento con medios condicionados por monocitos THP1 no activados (THP-control) o diferenciados a macrófagos (medio inflamatorio, THP-PMA). Análisis de la actividad celular de ambos grupos en el momento del tratamiento (0h), a las 24 horas (24h) y a las 48 horas (48h) de incubación con el tratamiento. (a) Gráfica donde observamos que la zona de reparación fue significativamente más amplia al tratar las células tumorales con medio THP-PMA. (b) Fotografía donde se observa esta mayor capacidad de migración celular que se correlacionó con la adquisición del fenotipo scattering con pérdida de la morfología epitelial (característica de células con mayor capacidad invasiva).

Otros autores han demostrado que el tratamiento de líneas celulares tumorales con citoquinas proinflamatorias exógenas aumenta su capacidad de proliferación (147, 148), migración (149-151) e invasión (152).

A partir de estos resultados se propone que algunas células tumorales sometidas a un ambiente inflamatorio adquieren un incremento de su capacidad invasiva que podría contribuir a su supervivencia y capacidad de dar lugar a una recurrencia tumoral.

2 HIPÓTESIS

La hipótesis del presente proyecto de investigación propone que los pacientes intervenidos de CCR con intención curativa que presentan una infección peritoneal en el postoperatorio desarrollan una respuesta inflamatoria, local y sistémica, que actúa directamente sobre células tumorales residuales, aumentando su capacidad para dar lugar a recidivas tumorales. Esta acción directa de la inflamación sobre las células tumorales residuales debería tener lugar mediante la liberación de factores solubles (por ejemplo, citoquinas) y podría ser identificada mediante ensayos *in vitro* con los que analizar ciertos parámetros de actividad celular relacionados con la progresión tumoral: proliferación, migración e invasión celular.

Una mayor capacidad de proliferación, migración e invasión de las células tumorales *in vitro* en el contexto de una infección peritoneal postoperatoria, podría explicar, al menos en parte, un posible mecanismo por el cuál existe un mayor porcentaje de recurrencia tumoral observado en aquellos pacientes que presentan una infección peritoneal tras la resección del tumor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

- Estudiar la respuesta inflamatoria y angiogénica en los pacientes intervenidos de CCR a los que se les practica una resección con intención curativa mediante el análisis cuantitativo en suero de un conjunto seleccionado de citoquinas. Comparar los resultados entre un grupo de pacientes que ha presentado una infección peritoneal postoperatoria y otro grupo de pacientes que no ha presentado ninguna complicación en el postoperatorio.
- Analizar el efecto del suero y del líquido peritoneal de pacientes intervenidos de CCR con intención curativa sobre la capacidad de proliferación, migración e invasión celular en dos líneas celulares de cáncer in vitro. Comparar los resultados entre un grupo de pacientes que ha presentado una infección peritoneal postoperatoria y otro grupo de pacientes que no ha presentado ninguna complicación en el postoperatorio.
- Investigar la asociación entre variables del paciente, características del tumor, resultados de la expresión de citoquinas inflamatorias y/o angiogénicas y los resultados de los ensayos in vitro con la recurrencia tumoral.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la expresión en suero de la citoquina proinflamatoria IL-6 y la citoquina angiogénica VEGF en pacientes sometidos a una resección de CCR con intención curativa y comparar los resultados de los pacientes que presentaron una infección en el postoperatorio con aquellos que no

presentaron ninguna complicación; con este objetivo pretendemos confirmar los resultados de nuestra serie previa.

- Determinar el perfil de expresión en suero de otras citoquinas inflamatorias y/o angiogénicas en pacientes sometidos a una resección de CCR con intención curativa y comparar los resultados de los pacientes que presentaron una infección en el postoperatorio con aquellos que no presentaron ninguna complicación.
- Estudiar la actividad proliferativa y la capacidad de migración e invasión in vitro de las líneas celulares MDA-MB-230 y SW620 tras aplicarles suero y líquido peritoneal de pacientes que han presentado una infección peritoneal postoperatoria y compararlo con los pacientes que no la han presentado.
- Comparar la recurrencia tumoral entre los pacientes intervenidos de CCR que presentaron una infección peritoneal postoperatoria con aquellos que no presentaron ninguna complicación.
- Estudiar la asociación entre variables del paciente, características del tumor, resultados de la expresión de citoquinas inflamatorias y/o angiogénicas y los resultados de los ensayos in vitro con la recurrencia tumoral.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Estudio prospectivo de cohortes con controles apareados.

4.2 Sujetos del estudio

4.2.1 Criterios de inclusión

Pacientes con cáncer de colon o recto (CCR) ingresados en la Unidad de Cirugía Colorrectal del Hospital del Mar a los que se les ha indicado una resección quirúrgica electiva con intención curativa.

4.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con el diagnóstico sincrónico de otro tumor primario.
- Pacientes a los que se realicen otros procedimientos quirúrgicos de forma sincrónica además de la resección de colon o recto.
- Pacientes en los que no es posible la resección curativa del tumor en el acto quirúrgico.
- Pacientes que precisan de cirugía urgente por CCR perforado u oclusivo.
- Pacientes con enfermedad metastática de CCR.
- Pacientes sin consentimiento informado.

4.2.3 Grupos de estudio

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión. De acuerdo con el curso postoperatorio los pacientes fueron incluidos en el grupo de infección o en el grupo control.

Los pacientes que presentaron en la evolución postoperatoria una infección intraabdominal en forma de absceso o peritonitis secundaria a una dehiscencia anastomótica se incluyeron en el grupo infección.

Para cada uno de los pacientes del grupo infección se seleccionó un control entre aquellos pacientes que no habían presentado ninguna complicación postoperatoria. El apareamiento se realizó de acuerdo con siete criterios: sexo, edad (± 5 años), fecha de la cirugía (± 3 años), abordaje quirúrgico (laparotomía o laparoscopia), localización del tumor (colon derecho - desde el ciego hasta la mitad proximal del colon transverso; colon izquierdo -desde la mitad distal del colon transverso hasta el sigma-; y recto -desde la unión rectosigmoidea hasta el canal anal-), estadio tumoral de acuerdo con la clasificación TNM (International Union Against Cancer, 7th edition) (14) y administración de quimioterapia y radioterapia neoadyuvante en los pacientes con cáncer de recto.

4.3 Técnica quirúrgica

Todos los pacientes fueron intervenidos utilizando las técnicas quirúrgicas habituales siguiendo unos estrictos criterios oncológicos. La resección de colon y recto fue realizada según la técnica usual en nuestro centro: hemicolectomía derecha con anastomosis mecánica latero-lateral en pacientes con neoplasias de ciego, colon ascendente y ángulo hepático; hemicolectomía izquierda en pacientes con neoplasias en colon descendente y ángulo esplénico; sigmoidectomía o resección anterior de recto en neoplasias de sigma y resección anterior o resección anterior baja en neoplasias de recto. En las resecciones de

colon izquierdo o recto se realizó una anastomosis término-terminal mecánica según la técnica del doble grapado. En aquellos pacientes en los que se realizó una resección anterior baja con una anastomosis a menos de 7 cm se realizó además una ileostomía derivativa. En pacientes con neoplasias de recto inferior que infiltraban el elevador del ano o el sistema esfinteriano se realizó una amputación abdominoperineal de Miles.

El abordaje, por cirugía abierta o laparoscópica, fue a criterio del cirujano responsable considerando las características del paciente y del tumor así como su propia experiencia en cada una de las técnicas. Los pacientes fueron intervenidos por cirujanos con amplia experiencia en cirugía colorrectal.

4.4 Cuidados perioperatorios

Todos los pacientes tuvieron el mismo tratamiento perioperatorio siguiendo las directrices del programa de rehabilitación multimodal o *fast-track* hasta presentarse una complicación postoperatoria, en caso de producirse. El programa de rehabilitación multimodal fue instaurado en la unidad de cirugía colorrectal del Hospital del Mar en Marzo de 2006 (153) y sigue vigente en la actualidad. Las estrategias más destacadas del programa son (154, 155):

- Fase preoperatoria: información oral y escrita por parte del cirujano responsable y de una enfermera en consultas externas. Los pacientes ingresan el día anterior a la intervención para realizar la preparación mecánica del colon (si está indicado) con polietilenglicol. A su vez, se les administra una solución hidrocarbonada (135 g de carbohidratos en 1000 cc) en forma de nutrición enteral (Edanec[®]) y se permite hidratación oral hasta 6 horas antes de la intervención quirúrgica.
- Fase intraoperatoria: Administración de antibioticoterapia profiláctica con dosis única de Gentamicina 240 mg y Metronidazol 2 g. Uso de anestésicos de acción corta. Hidratación ajustada con reposición de

pérdidas hemáticas y pérdidas insensibles ajustadas a 6-8 ml/Kg/h. Administración de sueroterapia a temperatura controlada y uso de manta térmica para evitar la hipotermia.

- Fase postoperatoria: Analgesia multimodal con analgesia epidural durante las primeras 48 horas. Dieta progresiva a partir de las 4-6 horas postoperatorias. Retirada de la sueroterapia cuando el paciente tolere la dieta líquida. Estimulación de la movilización precoz.

En ausencia de complicaciones, los pacientes fueron dados de alta hospitalaria con una correcta tolerancia a la dieta sólida, dolor controlado con analgesia oral y buena movilización.

El protocolo de rehabilitación multimodal en cirugía colorrectal no considera dentro de sus estrategias el uso de drenajes intrabdominales. Sin embargo, se dejaron drenajes aspirativos de baja presión tipo Blake (drenaje de silicona de 15 Fr. redondo con reservorio J-VAC de 100 cc de Johnson & Johnson, España) en el lecho quirúrgico al finalizar la intervención quirúrgica. Estos drenajes sirvieron para la obtención de muestras de líquido peritoneal en el postoperatorio y se retiraron, generalmente, al cuarto día de la intervención quirúrgica una vez tomadas las muestras correspondientes.

4.5 Variables y recogida de datos

Se registraron los siguientes datos y variables de cada paciente:

- Características demográficas y clínicas de los pacientes:
 - Sexo
 - Edad
 - Antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorio

- Datos de la intervención quirúrgica:
 - Localización del tumor: colon derecho, colon transverso, colon izquierdo, colon sigmoide y recto.
 - Vía de abordaje: laparotomía o laparoscopia
 - Conversión a cirugía abierta
 - Tipo de intervención quirúrgica: hemicolectomía derecha, hemicolectomía derecha ampliada, colectomía subtotal, colectomía total, hemicolectomía izquierda, sigmoidectomía, resección anterior de recto o amputación abdominoperineal de Miles.
 - Tiempo quirúrgico
 - Necesidad de transfusión perioperatoria
- Características histopatológicas del tumor:
 - Tipo histológico
 - Grado de diferenciación tumoral
 - Número de ganglios aislados y número de ganglios afectos
 - Estadio tumoral
 - Invasión linfovascular y perineural
- Datos del postoperatorio y complicaciones:
 - Estancia hospitalaria
 - Morbilidad postoperatoria (tipo de complicación)
 - Tratamiento de la complicación
 - Reintervención
 - Reingreso (hasta los 30 días después de la intervención quirúrgica)
- Tratamiento neoadyuvante y/o adyuvante
- Seguimiento oncológico:
 - Tiempo de seguimiento
 - Recurrencia tumoral local
 - Recurrencia tumoral sistémica

- Fecha de diagnóstico de recurrencia
- Mortalidad relacionada o no con el cáncer

4.6 Definición de infección peritoneal como complicación postoperatoria: absceso intraabdominal y dehiscencia anastomótica.

La infección peritoneal postoperatoria se presenta como un absceso intraabdominal o una peritonitis localizada o generalizada secundaria a una dehiscencia anastomótica con repercusión clínica en forma de sepsis.

El absceso intraabdominal se define como una colección líquida intraabdominal asociada a fiebre y/o leucocitosis con cultivo positivo. Generalmente, su tratamiento consiste en la administración de antibióticos y el drenaje percutáneo de la colección.

La dehiscencia anastomótica se define como aquella complicación debida a una fuga de contenido intestinal a través de la anastomosis, que generalmente ocurre entre el cuarto y séptimo día de la intervención quirúrgica, produciendo secundariamente una peritonitis localizada o generalizada y una sepsis asociada. Su diagnóstico es fundamentalmente clínico, y se confirma radiológicamente mediante la realización de una tomografía axial computerizada (TAC) y la administración simultánea de un enema con contraste hidrosoluble (Gastrografín®) o durante la reintervención quirúrgica. Su tratamiento precisa, en la mayoría de los casos, una reintervención quirúrgica.

4.7 Obtención y análisis de las muestras de sangre y líquido peritoneal

4.7.1 Muestras de suero

Se obtuvo una muestra de 10 cc de sangre antes de iniciar la intervención quirúrgica. Posteriormente, se extrajeron muestras adicionales al 4º día y/o en el momento en el que el paciente presentó una infección peritoneal, en caso de que esta ocurriera. La sangre se centrifugó (Centrifugadora Eppendorf, Modelo 5702, Hamburgo, Alemania) inmediatamente después de su extracción a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a 4ºC. El suero resultante fue congelado y almacenado a -80ºC hasta el momento de su análisis.

4.7.2 Muestras de líquido peritoneal

Inmediatamente después de la laparotomía o tras la introducción de los trócares, en el caso de la cirugía laparoscópica, se realizó un lavado peritoneal con 100cc de suero fisiológico durante 5 minutos. Posteriormente, se extrajo una muestra de 10 cc. Al 4º día y/o en el momento en el que el paciente presentó una infección peritoneal, se obtuvieron muestras de 10 cc de líquido peritoneal a través del drenaje. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a 4ºC. El líquido resultante fue almacenado en alícuotas y congelado a -80ºC hasta su análisis.

4.7.3 Determinación de citoquinas (IL-6 y VEGF) por el ensayo ELISA en muestras de suero

La concentración sérica de citoquina proinflamatoria IL-6 y del factor angiogénico VEGF se determinó mediante la técnica ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o ensayo por immunoabsorción ligado a enzima, con el kit

comercial RayBio® Human IL-6 o VEGF ELISA kit (Ray Biotech, Inc., Norcross, GA).

El ensayo ELISA es una técnica cuantitativa de inmunoensayo en el cual un antígeno a estudio se detecta mediante un anticuerpo primario anti-antígeno que recubre los pocillos de una microplaca. En una segunda reacción, el anticuerpo primario es reconocido por un anticuerpo secundario el cual está conjugado a la enzima peroxidasa. Así pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base de los pocillos que lo retiene y a un segundo anticuerpo que lo marca. Finalmente, se realiza una incubación con un sustrato específico de la peroxidasa que al oxidarse da lugar a un producto coloreado cuya cantidad puede medirse en un colorímetro. La aparición de color permite obtener una medida relativa de la cantidad de antígeno en cada muestra (figura 7).

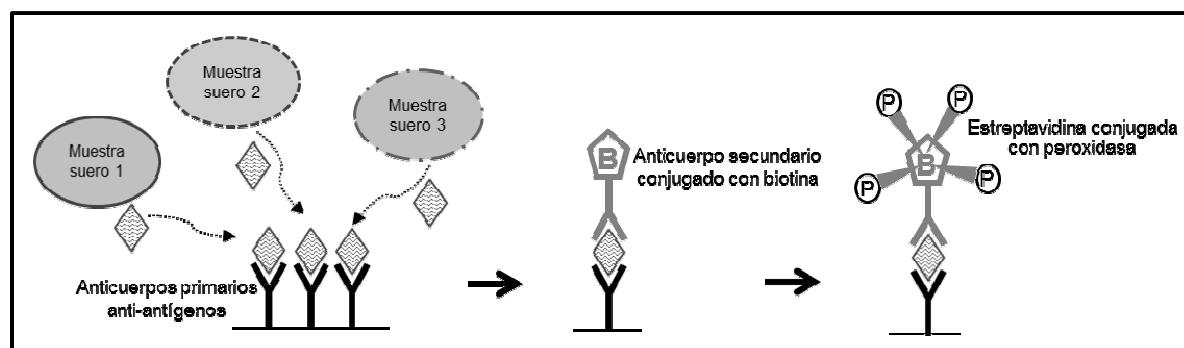


Figura 7. Representación esquemática del ensayo ELISA para la detección de un solo antígeno (en nuestro caso IL-6 o VEGF) al aplicar diferentes muestras de suero.

Paralelamente a las muestras que se quieren estudiar, se realiza una recta patrón con un contenido conocido de la citoquina a estudio. Es decir, se realizan diluciones sucesivas conocidas de proteína recombinante con las que se obtiene una recta patrón. A partir de esta recta patrón se puede obtener una estimación de la concentración real de la citoquina extrapolando las medidas relativas obtenidas en la recta patrón. Además, para aumentar el nivel mínimo de detección del antígeno, el protocolo utilizado en el presente estudio incluyó un segundo anticuerpo conjugado a biotina y se realizó una tercera incubación con

estreptavidina conjugada a peroxidasa. Una molécula de biotina se une a cuatro de estreptavidina. De esta manera se consigue amplificar la señal a partir de una sola molécula de antígeno. Específicamente, a este tipo de ensayo ELISA se le denomina ELISA tipo “sandwich” o ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos.

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial, así como la preparación y dilución de todos los reactivos. Las muestras a estudio fueron diluidas 1:3 con el diluyente específico entregado en el kit comprobando que el resultado estuviese dentro de los valores de la recta patrón. Si no era así, se repitió el ensayo con diluciones mayores. Se realizaron duplicados de todas las muestras. En cada microplaca de 96 pocillos se incluyeron los controles positivos y los controles negativos. Los controles positivos fueron representados por la recta patrón. Y los controles negativos son muestras dónde se tiene certeza de la ausencia del antígeno a estudio, en otras palabras, sólo se añade el diluyente en estos pocillos. El ensayo se realizó a temperatura ambiente en el laboratorio y las incubaciones se colocaron en un agitador oscilante de sobremesa.

Se inició el ensayo pipeteando 100 µl por pocillo de cada muestra diluida y se realizó la rectapatrón por duplicado (que incluía los controles positivos y negativos). Se incubaron las muestras con el anticuerpo monoclonal (primario) adherido al fondo de los pocillos durante 2,5 horas. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con 300 µl por pocillo de solución de tampón de lavado. Después se desechó el exceso de anticuerpos de los pocillos con los lavados, y se aplicó 100 µl por pocillo del anticuerpo policlonal (secundario). Se trata de un anticuerpo biotinilado que se diluyó 1:80 previamente. Después de una hora de incubación, se realizaron 4 lavados más para eliminar el material no fijado. Tras el último lavado, se añadió la estreptavidina marcada con horseradish peroxidasa (HRP-Estreptavidina) para la detección de anticuerpos marcados con biotina (el anticuerposecundario), diluida 1:300.

Después de una incubación de 45 minutos, se eliminaron todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos con 4 lavados más.

Posteriormente, se añadió 100 μ l por pocillo del sustrato enzimático de tetramethylbenzidine (TMB) que desencadenó la reacción colorimétrica (azul). Se incubó la placa a temperatura ambiente en el agitador oscilante y en este último paso, se incubó en la oscuridad durante 30 minutos. Finalmente, se añadieron 50 μ l por pocillo de la solución final que inactivó la reacción y provocó un cambio del color azul al amarillo (figura 8). La cantidad de color es proporcional a la cantidad de antígeno (IL-6 o VEGF) que se fijó inicialmente. Inmediatamente se mide la intensidad del color en un lector de ELISA (espectrofotómetro) a una longitud de onda de 450 nm.

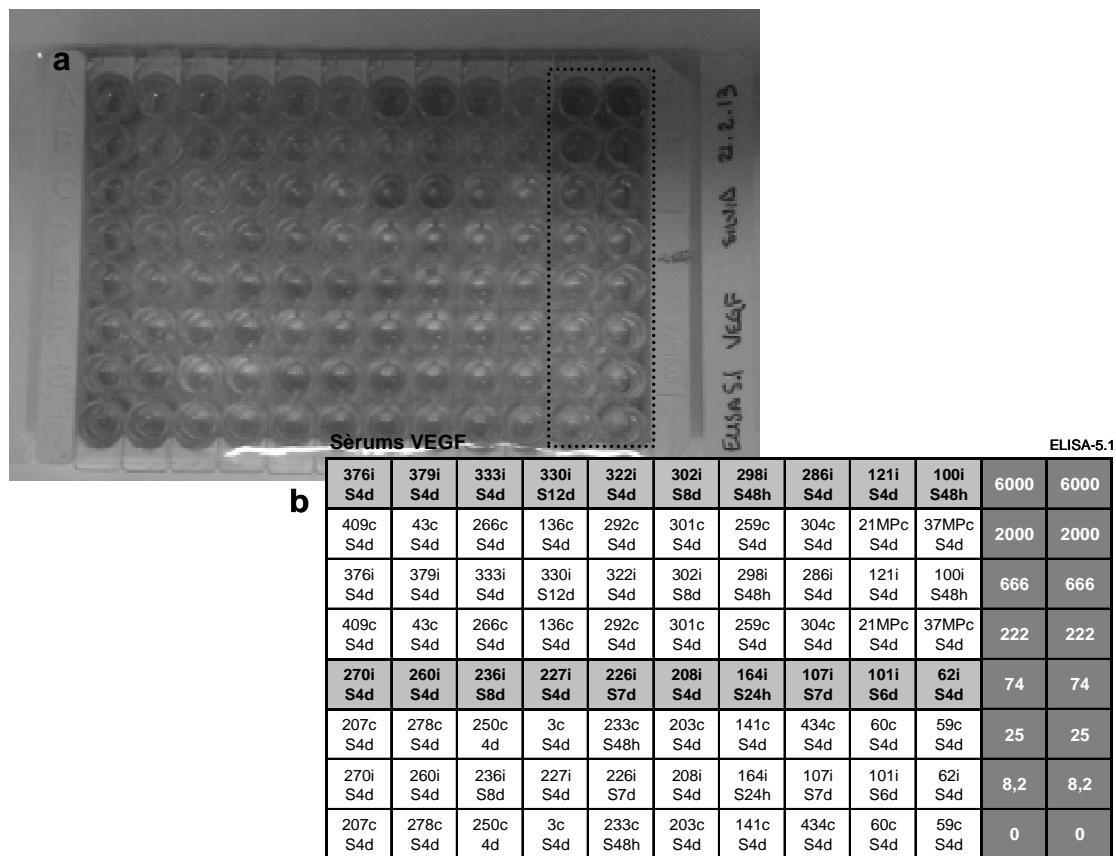


Figura 8: **(a)** Fotografía de una microplaca de 96 pocillos dónde se ha realizado un ensayo de ELISA para detectar VEGF. **(b)** Esquema de una plantilla diseñada para un ensayo ELISA. Observamos en las 2 últimas columnas de la fotografía **(a)** un gradiente de la intensidad de color (de mayor a menor) que corresponde, como indica la plantilla **(b)** a las diluciones consecutivas del antígeno a estudio (VEGF) o recta patrón.

El resultado final se expresó como concentración real de la citoquina en cada muestra extrapolando los valores de densidad óptica al patrón de cada ensayo y corregido por las diluciones de las muestras empleadas. En caso de obtenerse

valores de densidad óptica que cayeron fuera de la recta patrón, fue necesario repetir el ensayo aumentando o disminuyendo la dilución de la muestra hasta obtener un valor fiable.

4.7.4 Arrays de anticuerpos

Se realizó un análisis de las concentraciones relativas de diversas citoquinas inflamatorias y angiogénicas en las muestras de suero de nuestros pacientes mediante el kit comercial RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array C series 1000 (Ray Biotech, Inc., Norcross, GA). Este método emplea membranas o micromatrices de proteínas basadas en anticuerpos disponibles comercialmente. Este array de anticuerpos permite la detección y cuantificación relativa de múltiples citoquinas de forma simultánea, en este caso 43 citoquinas repartidas en dos membranas (figura 9). Se trata de un sistema cualitativo que, si se combina con la medición por ELISA en paralelo para cada muestra de una de las citoquinas contenidas en las membranas, permite realizar un análisis semi-quantitativo, es decir, expresar la cantidad relativa de cada citoquina entre las distintas muestras.

RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array 1								
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
2	POS	POS	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78	b FGF
3	GRO	INF-γ	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
4	GRO	INF-γ	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTIN	MCP-1	PDGF-BB
5	PIGF	RANTES	TGF-β1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
6	PIGF	RANTES	TGF-β1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF	VEGF-D
7	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS
8	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Neg	POS

RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array 2								
	a	b	c	d	e	f	g	h
1	POS	POS	NEG	NEG	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiostatin	Endostatin
2	POS	POS	NEG	NEG	Angiopoietin-1	Angiopoietin-2	Angiostatin	Endostatin
3	G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-4
4	G-CSF	GM-CSF	I-309	IL-10	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-4
5	I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF-α
6	I-TAC	MCP-3	MCP-4	MMP-1	MMP-9	PECAM-1	Tie-2	TNF-α
7	u PAR	VEGF R2	VEGF R3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
8	u PAR	VEGF R2	VEGF R3	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

Figura 9. Esquema del array de anticuerpos dónde se incluyen las 43 citoquinas a estudio. Modificado de RayBio® Human Angiogenesis Antibody Array C series 1000 (Ray Biotech, Inc., Norcross, GA).

Para el procesamiento de las muestras se siguieron las instrucciones de la casa comercial con nuestras muestras diluidas diez veces (1:10); específicamente se pipetearon 120 µl de cada muestra con 1080 µl de tampón de bloqueo. En cada experimento se procesaron las muestras de 4 pacientes (2 parejas del estudio). El ensayo se realizó en el laboratorio a temperatura ambiente y las incubaciones se realizaron sobre un agitador oscilante.

Se colocaron las membranas que contienen los anticuerpos primarios de las citoquinas a detectar, una en cada pozo de una placa proporcionada por la casa comercial. Se añadieron 2 ml de tampón de bloqueo en cada pozo y se incubó durante 30 minutos. Tras la retirada del tampón se pipetearon las muestras (1,2 ml) a estudio y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas o a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se deshecharon las muestras y se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con 2 ml de tampón de lavado. Los 3 primeros lavados con el tampón de lavado número 1 y los 2 últimos con el tampón de lavado número 2, proporcionados por la casa comercial. Tras la extracción del

último lavado se añadió 1 ml de los anticuerpos conjugados con biotina (anticuerpo secundario) diluidos previamente y entregados también por la casa comercial. El anticuerpo conjugado con biotina 1 para la membrana 1 y el anticuerpo 2 para la membrana número 2. Así, se dejó incubando durante toda la noche a 4°C o durante 2 horas a temperatura ambiente, siempre sobre un agitador oscilante. Después de la incubación, se retiró el anticuerpo conjugado con biotina sobrante al realizar 5 lavados de las mismas características que se han explicado anteriormente. Inmediatamente después del último lavado, se añadió a cada membrana 1ml de HRP-Estreptavidina previamente diluida 1:1000 con tampón de bloqueo. Se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después se realizaron de nuevo 5 lavados con 2 ml de tampón de lavado 1 y 2, y se mantuvo la solución del último lavado hasta poder realizar la lectura de sus resultados para evitar la deshidratación de las membranas. Se preparó el tampón de detección siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se retiró el exceso de solución del último lavado y se colocaron las membranas sobre un papel de film plástico cara arriba. Inmediatamente, se aplicó 400 µl de tampón de detección por membrana asegurando que éstas quedasen bien recubiertas sin burbujas de aire. En este caso, el tampón de detección contiene el sustrato de la peroxidasa que al oxidarse emite luz (luminiscencia), a diferencia de los sustratos usados en ELISA que adquieren un color. Tras una incubación de 2 minutos se colocaron las membranas sobre una superficie dura a modo de bandeja (por ejemplo, un film de autorradiografía usado) y se cubrió y fijó con un papel de film de nuevo evitando burbujas de aire (figura 10).

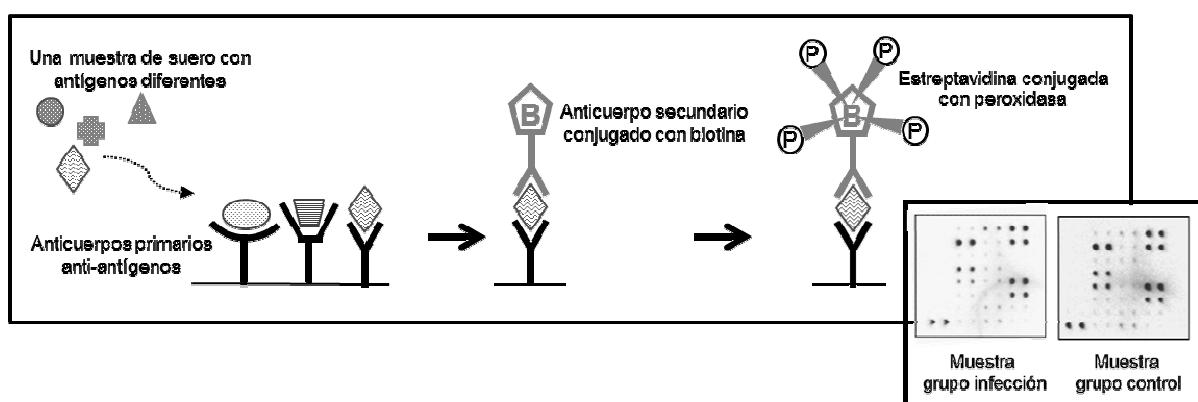


Figura 10. Representación esquemática de un ensayo de array de anticuerpos, dónde detectamos 43 proteínas diferentes en una muestra de suero. En nuestro ensayo procesamos las muestras por parejas.

Finalmente las membranas fueron reveladas utilizando un sistema de captación de imagen (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS System, BioRad Laboratories, Inc., Hercules, California) equipado para la detección de quimioluminiscencia. Para la captación y análisis de densitometría usamos el software “Quantity One 4.6”. Se captaron exposiciones acumuladas cada minuto (si en la primera ya hubo sobreexposición, se redujo el tiempo), y luego se escogió la última imagen que no mostraba saturación en ninguno de los *dots* (círculos alrededor de cada detección de anticuerpo a estudio). A partir de esa imagen, se realizó el análisis de densitometría utilizando círculos del mismo tamaño para cada dot, más cuatro círculos adicionales para calcular el *background*. Además de este background general, el análisis incluye una corrección para cada círculo (*background subtraction method*) que permite eliminar la señal de fondo en zonas donde aparece una mancha. Consiste en calcular un valor de fondo estimado para el total del círculo a partir de la señal de color contenida en la primera hilera interna de píxeles de cada círculo, y luego sustraer este valor de fondo corregido para el tamaño del círculo del valor obtenido en el volumen total del círculo correspondiente (figura 11).

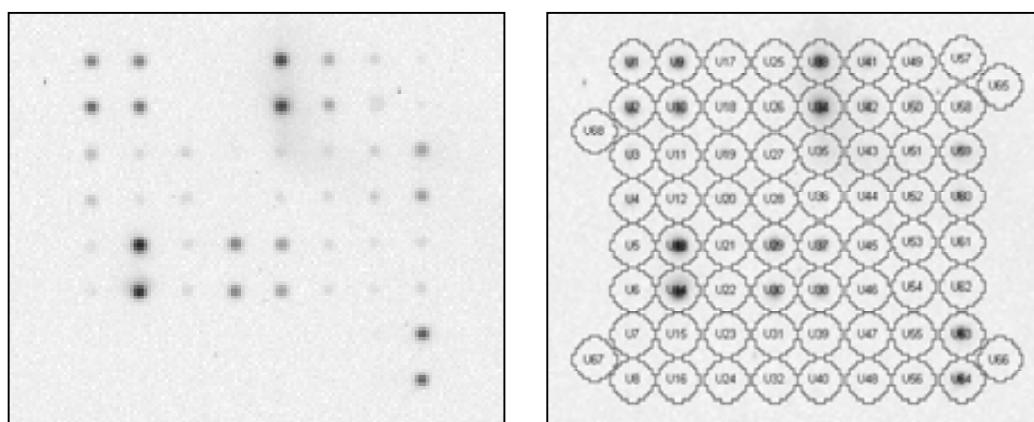


Figura 11. Fotografía que muestra un ejemplo de una membrana con diferentes intensidades de *dots* (izquierda) y análisis de densitometría utilizando círculos del mismo tamaño para cada *dot* (derecha), más cuatro círculos adicionales (círculos periféricos) para calcular el *background*.

Al final se obtuvo el listado de resultados como *adjusted volume*, que es el que se introdujo en la aplicación Excel proporcionada por el kit (RayBio® Angiogenesis

Array C-1000 Analysis Tool; Ray Biotech, Inc., Norcross, GA) que proporcionó un valor para cada antígeno del estudio.

Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se realizó una normalización de los valores de citoquinas resultantes de cada membrana con un control positivo. El objetivo de esta normalización es poder comparar los resultados obtenidos entre membranas. Además, también recomiendan la normalización de este valor de forma arbitraria con un valor de 10.000 para cada control positivo de las muestras analizadas. El control positivo utilizado por la casa comercial es el anticuerpo secundario implicado en la misma reacción de inmunohistoquímica para la detección de las citoquinas. Sin embargo, este normalizador no tiene en cuenta variaciones del ensayo, entre membranas diferentes, sucedidas previamente a la aplicación del anticuerpo secundario. Para poder comparar los resultados entre las diferentes membranas, se normalizaron los resultados obtenidos para cada muestra, con los valores de IL-6 detectados por ELISA utilizando el kit de la misma casa comercial que los arrays.

4.7.5 Ensayos in vitro

4.7.5.1 Líneas celulares

Para los ensayos in vitro utilizamos 2 líneas celulares humanas establecidas y comercializadas: MDA-MB-231 y SW620. La MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer mamario y la línea celular SW620 proviene de adenocarcinoma de colon metastatizado a ganglios linfáticos en humanos (figura 10).

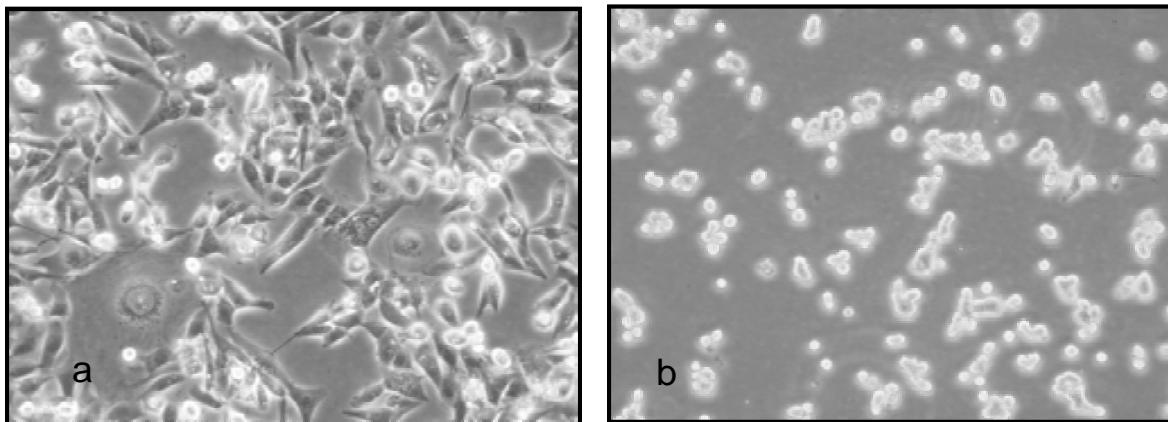


Figura 12. Fotografía de la línea celular MDA-MB-231 (**a**) y SW620 (**b**) empleadas en los ensayos in vitro.

4.7.5.2 Mantenimiento de cultivos celulares

Los cultivos celulares de las líneas MDA-MB-231 y SW620 se mantuvieron con medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina 100 mU/ml y estreptomicina 100 mg/ml) en frascos de cultivo celular de 75 cm². Las condiciones de mantenimiento de los cultivos en una incubadora celular standard fueron 37°C de temperatura, 5% de dioxido de carbono (CO₂) y 100% de humedad relativa.

Para el mantenimiento de las líneas celulares se realizaron diluciones de densidad celular y se cambió el medio cada 2-3 días en una campana de flujo laminar. A este proceso se le denomina pase celular. El objetivo es transferir un pequeño grupo de células en un nuevo frasco y añadirle medio de cultivo fresco. Este proceso impide la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y células apoptóticas, y repone los nutrientes del medio de cultivo para favorecer el crecimiento celular.

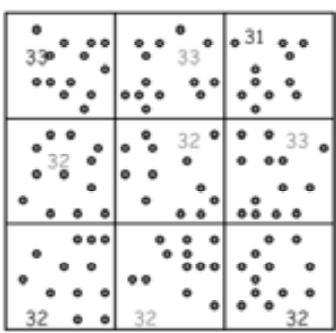
En detalle, el procedimiento se inició con la extracción del medio de cultivo del frasco seguido de un lavado de las células con un tampón (tampón fosfato en solución salina, PBS). Ambas líneas celulares crecen adheridas a un substrato, en este caso el plástico del frasco. Por este motivo es necesario disgregarlas para obtener una suspensión celular. Para ello, se utilizó una solución de tripsina. La tripsina es una proteasa que digiere aquellas proteínas celulares implicadas en la

adhesión celular al soporte. Así, se empleó una solución de tripsina que actuó en las células durante 5 minutos en la incubadora a 37°C. Posteriormente, se añadió DMEM con 10% FBS, que detiene la acción de la tripsina, y se centrifugó la solución a 1000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular que quedó con 10cc de DMEM con 10% FBS.

Para mantener unas condiciones de cultivo reproducibles entre pases y experimentos, es necesario sembrar las células a la misma densidad y que esta densidad sea controlada por el investigador. Esto supone conocer el número de células viables de la suspensión celular. Para ello, es necesario contar el número de células vivas. Se utilizó el colorante azul de tripano que tiñe los núcleos de las células con la membrana dañada, es decir, células muertas, permitiendo realizar un contejo de las células vivas en una cámara de Neubauer.

A modo de ejemplo, se aspiraron 20 µl de los 10 ml de la suspensión celular obtenida tras la tripsinización y se mezclaron con 80 µl de solución de azul de tripano (dilución 1/5) en un tubo eppendorf. Después se pipetearon 10 µl de esta nueva suspensión a cada lado del hemocitómetro o cámara de recuento de Neubauer (obtuvimos un duplicado del contejo cuya diferencia debía ser menor al 10% para considerarla correcta). Bajo el microscopio, se observaba la cuadrícula de 9 cuadrados grandes cada uno subdividido en 16 cuadrados más pequeños. El contejo de células se realizó en dos cuadrados grandes a cada lado de la cámara, de manera que se obtuvieron cuatro determinaciones del número de células en un cuadrado grande. Después, se realizó una media del contejo de los 4 cuadrados grandes a ambos lados de la cámara (para obtener un resultado duplicado). Para reducir el error de recuento, se consideró un número mínimo de 100 células contadas en total (lo que normalmente correspondía a 4 cuadrados). El volumen de medio instilado en cada cuadrado grande es de 0.1 µl o 10^{-4} ml. Así, la media de los contejos indica el número de células en 0.1 µl de la suspensión de células en azul de tripano. Este proceso se realizó por duplicado.

En este caso sería:



$33+31+32+32= 126$ células en un cuadrado.

El resultado del contejo del duplicado es 114 células. La diferencia entre ambos resultados es <10%, por lo que se consideró válido el contejo.

$126+114= 240$ células.

240 células / 2 duplicados = 120 células.
 120 células / 4 cuadrados grandes contados (4 en cada duplicado) = 30 células por cuadrado grande.

Dado que conocemos el volumen de cada cuadrado ($0.1 \mu\text{l}$ o 10^{-4}ml), el volumen de la solución celular inicial de 10ml y la dilución con azul de tripano de 1/5; podemos calcular cuantas células tenemos en nuestra solución.

$$30\text{células/cuadrado} \times 10\text{ml de solución} \times 5 \text{ (dilución con azul de tripano 1/5)} \times 10^4 \text{ (1cuadrado/10}^{-4}\text{ ml)} = 1.5 \times 10^7 \text{ células}$$

En nuestra solución celular de 10 ml tenemos 1.5×10^7 células en total o 1.5×10^6 células/ml.

A partir de este cálculo podemos sembrar los frascos a la densidad celular deseada.

En todos los casos se superó el 95% de viabilidad celular en ambas líneas celulares. Todos los experimentos fueron realizados con celulas procedentes de pases celulares entre 3 y 10.

4.7.5.3 Ensayo de actividad hexosaminidasa

La actividad de la hexosaminidasa se utilizó como parámetro para estimar el número de células relativo para determinar el crecimiento de cultivos celulares en los ensayos de proliferación y para analizar la movilidad celular en los ensayos de migración e invasión. La hexosaminidasa es una enzima lisosomal que se expresa únicamente en células vivas; por lo que el nivel de enzima hexosaminidasa medido en una preparación celular es proporcional al número de células viables. Se realizaron ensayos colorimétricos para la detección de la hexosaminidasa. Específicamente, se utilizó el método colorimétrico diseñado por Landegren (156) y modificado por Givens (157). Este ensayo colorimétrico emplea 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminida como el sustrato sintético para detectar la actividad de la enzima hexosaminidasa. Antes de la lectura final, se aplicó una solución de revelado que detiene la reacción de la hexosaminidasa. El producto de esta reacción da lugar a una emisión colorimétrica (amarillo) proporcional al tamaño de la población celular que puede cuantificarse en el espectrofotómetro o colorímetro de placas.

Los reactivos utilizados en los ensayos colorimétricos de proliferación, migración e invasión fueron:

- Sustrato de hexosaminidasa: Por 100ml de sustrato de hexosaminidasa se requieren 0,128g (7,5 mM) 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma N-9376) en 1,470g (0,1 M) de Citrato Sódico disuelto en 100ml de agua milli Q ajustado a pH 5,0 con 10 N HCl. Finalmente, la solución es mezclada con 250 μ l (0,25%) Triton X-100. Para conseguir una disolución completa la solución debe estar a 40°C y posteriormente, se puede almacenar a -20°C (156).
- La solución de revelado de la hexosaminidasa se obtuvo con 0,75 g (150 mM) de Glycine y 2 ml (5 mM) de EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) disueltos en 200ml de agua milliQ y ajustado a pH 10,4 con 10 N NaOH. La solución final puede ser alicuotada y almacenada a -20°C (156, 157).

4.7.5.4 Puesta a punto del ensayo de actividad de hexosaminidasa

El ensayo de actividad de hexosaminidasa es un ensayo sencillo, rápido y validado para cuantificar el crecimiento celular (157). En la literatura se encuentran más de 100 artículos que utilizan este método en ensayos de proliferación celular citando el trabajo inicial de Landegren et al (156). En las condiciones experimentales de este trabajo, el ensayo es factible y válido como medida cuantitativa de células vivas al validar el experimento con el conteo celular directo de un grupo representativo de las muestras de nuestro estudio.

Cabe mencionar que previamente se descartaron otros métodos similares de cuantificación celular en los que se utilizan sustratos metabólicos de las células. En el estudio de proliferación celular se planteó utilizar un kit comercial denominado Cell Titer-Blue® Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, USA). Se trata de un ensayo de proliferación celular de uso generalizado en investigación. Se basa en medir la actividad oxidativa de las células (mayoritariamente actividades oxido-reductasa/deshidrogenasa mitocondriales) como medida del número de células del cultivo mediante un sustrato que al ser reducido en la reacción emite fluorescencia. Estos ensayos no eran adecuados

porque se comprobó que el tratamiento con muestras de suero y líquido peritoneal, por si mismo, ya modificaba la actividad de las enzimas metabólicas implicadas de una manera independiente a sus efectos sobre la proliferación celular. Es decir, el número de células detectado por fluorescencia no se correspondía con el recuento de células al microscopio óptico. Por lo que se tuvo que abandonar el uso de este kit comercial y usar el ensayo de actividad de hexosaminidasa.

Para continuar con el protocolo del ensayo de hexosaminidasa en nuestras condiciones de experimentación se realizaron diferentes ensayos para determinar las condiciones óptimas de trabajo.

En primer lugar, se realizaron ensayos preliminares de proliferación, migración e invasión con diferentes líneas de cáncer de colon HT-29, LoVo, CT-26, COLO 201, LS174T, SW480, Caco-2 y SW620 así como la línea de cáncer mamario MDA-MB-231 (recomendada por la casa comercial que suministra el material de ensayos de migración e invasión). Finalmente se eligieron las líneas SW620 de adenocarcinoma de colon metastatizado a ganglios linfáticos para los ensayos de invasión y la línea celular MDA-MB-231 de carcinoma de mama humano como la más idónea para los ensayos de migración. Estos modelos celulares dan lugar a tasas de migración e invasión moderadas en condiciones basales, por lo que se consideraron óptimas para poder detectar tanto aquellos sueros como líquidos peritoneales que estimulan la actividad de las células, como aquellos que la inhibían.

Para poder determinar la densidad celular idónea para sembrar las células en los ensayos, se realizó una recta patrón de diferentes concentraciones de ambas líneas celulares. El objetivo era encontrar una densidad celular que permitiese un crecimiento de los respectivos cultivos durante el periodo de duración del experimento tal que, al final del mismo, no tenía lugar ningún fenómeno de inhibición de la proliferación celular por contacto al compactarse la capa de células, por ejemplo, sino que los cultivos seguían creciendo activamente. Al

mismo tiempo, esta densidad celular idónea tenía que dar lugar a un número de células a partir del cual, una activación o inhibición sobre el crecimiento resultaba claramente detectable (figura 13). Además, este ensayo es sensible y capaz de detectar concentraciones bajas de células en comparación con otros ensayos colorimétricos (170). Para los ensayos de proliferación, migración e invasión, se ha validado su nivel mínimo de detección en 5.000 células (figura 13).

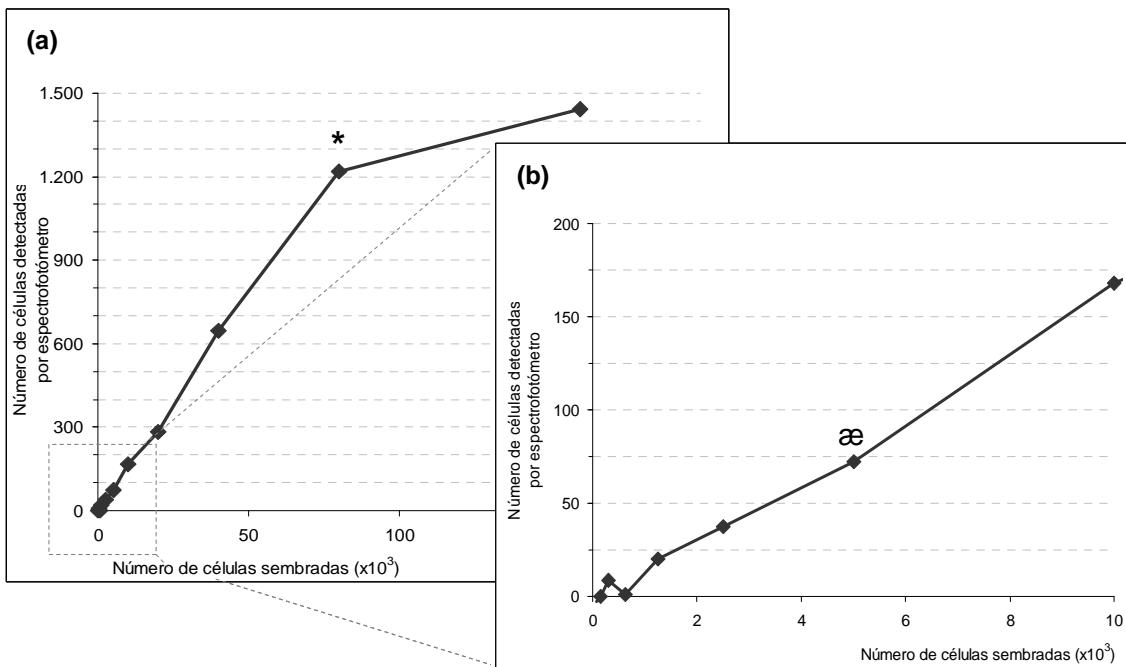


Figura 13: Gráficas de la curva patrón dónde se han sembrado diferentes concentraciones de células MDA-MB-231 (eje de abscisas) y su correspondiente detección en el espectrofotómetro (eje de ordenadas). (a) Observamos una saturación celular a partir de la siembra de 80.000 células MDA-MB-231 (*). (b) Ampliación de la gráfica (a). Hasta sembrar 5.000 células (∞) encontramos detecciones en el espectrofotómetro que no siguen una recta; y a partir de 5.000 células observamos una crecimiento lineal, dónde al aumentar el número de células sembradas aumenta de forma proporcional el número de células detectadas por espectrofotómetro.

De esta manera, se llegó a la conclusión de que la concentración celular óptima en nuestras condiciones de trabajo para los ensayos de proliferación es de 1×10^4 células por pocillo de MDA-MB-231 y 2×10^4 células por pocillo de SW620; para el ensayo de migración es 0.5×10^5 células por pocillo de MDA-MB-231 y para el ensayo de invasión es 1×10^5 células por pocillo de SW620.

Para los ensayos de invasión con células SW620, además se realizaron ensayos preliminares para averiguar el volumen y la concentración de membrana BME que daba mejores resultados de invasión. Para la línea celular SW620 se observó que al suplementar el cultivo con un reactivo estimulador de la migración como el PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) existía una mejor actividad de invasión en respuesta a la presencia de FBS respecto a controles sin FBS (ver Materiales y Métodos). Por tanto, para poner de manifiesto la actividad invasiva de las células SW620, todos los experimentos de invasión con esta línea celular fueron realizados en presencia de PMA 200 nM.

El FBS contenido en el medio de cultivo puede contener niveles muy bajos de enzima hexosaminidasa, aunque suficientes para alterar los resultados si los valores o diferencias dentro de un ensayo no son muy altos. Por este motivo, en todas las placas hemos utilizado controles negativos (156) que consisten en pozos sin células cuyos valores de ensayo hexosaminidasa serán restados del resto de pozos de cada placa como valor de fondo.

4.7.5.5 Preparación de las muestras (suero y líquido peritoneal)

Los sueros de los pacientes a estudio fueron diluidos al 10% en medio IMDM (Iscover's Modified Dulbecco's Medium) suplementado con Insulina, Transferrina y Selenium (ITS solution; Life Technologies, Paisley, UK) y el 10% de FBS.

Las muestras de líquido peritoneal también fueron diluidas al 10% en medio IMDM con ITS y al 10% de FBS. Posteriormente a la dilución, la muestra se filtró de forma estéril con una unidad de filtración Millex® (33 mm) con membrana MF-Millipore™ (Merck Millipore Ltd., Cork, Irlanda). El objetivo de esta filtración fue eliminar partículas o precipitados de la muestra no disueltos de tamaño superior al poro (0,22 µm) para minimizar el riesgo de interferencias con los resultados.

Se realizaron experimentos previos al ensayo definitivo, con el objetivo de detectar la concentración mínima de muestra imprescindible para revelar

diferencias. Además, las muestras son finitas por lo que era importante utilizar la mínima cantidad de muestra para poder realizar varios ensayos y poder repetirlos.

4.7.5.6 Diseño de las placas de los ensayos de proliferación, migración e invasión

Las placas utilizadas para los ensayos de proliferación, migración e invasión contenían 96 pocillos. Todos los ensayos se realizaron al menos dos veces y en días diferentes. En todas las placas se realizaron duplicados de las muestras para disminuir la variabilidad al considerar el resultado final la media de los resultados (figura 14).

MDAMB231 S											
PLACA TRANSPARENT HEX.7.2											
HEX-7											
260i B	298i B	302i B	327i B	350i B	368i B	421i B	407i B	406i B	421i 10d	MDA 20.000	MDA 20.000
260i id	298i 48h	302i 4d	327i 3d	350i 4d	368i 48h	421i 4d	407i 4d	406i 4d	407i 7d	MDA 10.000	MDA 10.000
278c B	259c B	301c B	324c B	296c B	210c B	402c B	359c B	287c B	406i 8d	MDA 5.000	MDA 5.000
278c 4d	259c 4d	301c 4d	324c 4d	296c 4d	210c 4d	402c 4d	359c 4d	287c 4d	MDA 10.000	MDA 2.500	MDA 2.500
260i B	298i B	302i B	327i B	350i B	368i B	421i B	407i B	406i B	421i 10d	MDA 1.250	MDA 1.250
260i id	298i 48h	302i 4d	327i 3d	350i 4d	368i 48h	421i 4d	407i 4d	406i 4d	407i 7d	MDA 0.625	MDA 0.625
278c B	259c B	301c B	324c B	296c B	210c B	402c B	359c B	287c B	406i 8d	MDA 312.5	MDA 312.5
278c 4d	259c 4d	301c 4d	324c 4d	296c 4d	210c 4d	402c 4d	359c 4d	287c 4d	MDA 10.000	NO CELLS 10% FBS	NO CELLS 10% FBS

Figura 14. Ejemplo de plantilla de una placa de ensayo de proliferación en muestras de suero en la línea MDA-MB-231. El control positivo (cuadrados grises oscuros) viene representado por un gradiente de concentración de células conocido, y está en duplicado. El control negativo (cuadrados negros) viene representado por pocillos sin células, y está también en duplicado. Las muestras de las parejas (cuadrados grises claros y blancos) también se analizan por duplicado.

El control positivo, siempre presente en cada placa por duplicado, consistió en diferentes diluciones de células a una concentración conocida distribuidas en 7 pocillos. Estos controles positivos nos permitieron construir un patrón de proliferación/migración/invasión celular en cada placa sometida a ensayo. De esta manera, se aseguró en cada ensayo la magnitud de los valores obtenidos de proliferación/migración/invasión, es decir, que la activación o inhibición respecto a

un control no tratado, caían dentro de una cinética lineal. Estos controles positivos son análogos a la recta patrón utilizada en los ensayos de ELISA.

El control negativo, también siempre presente en cada placa por duplicado, estuvo representado por medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de FBS sin presencia de células. Estos pocillos sin células indicaron los valores de actividad enzimática de fondo de la reacción de la hexosaminidasa en las condiciones del ensayo. Para el análisis final, se restó este valor a todos los resultados obtenidos en los diferentes pocillos tratados con las muestras del estudio.

4.7.5.7 Ensayo de proliferación celular

Previamente al inicio del ensayo se realizó un nuevo pase de células con cambio de medio (descrito en el apartado 4.7.5.2). Se realizó el conteo de cada una de las líneas celulares, con el objetivo de sembrar las células en placas de 96 pocillos en duplicados a una densidad de 1×10^4 células por pocillo de MDA-MB231 y 2×10^4 células por pocillo de SW620. Estas densidades celulares permitían un crecimiento de los respectivos cultivos durante el periodo de duración del experimento tal que, al final del mismo, no tenía lugar ningún fenómeno de inhibición de la proliferación celular por contacto al compactarse la capa de células sino que los cultivos seguían creciendo activamente. Al mismo tiempo, estas densidades daban lugar a un número de células a partir del cual, efectos positivos o negativos sobre el crecimiento resultaban claramente detectables.

Se sembraron 50 μl por pocillo de células en DMEM suplementado con el 10% de FBS. Posteriormente, se realizó un periodo de incubación de 24 horas. Al día siguiente, una vez las células se adherieron al fondo del pocillo, se retiró el sobrenadante de cada pocillo. Inmediatamente, se aplicó la muestra de suero o líquido peritoneal que se quiso estudiar según el esquema diseñado (figura 11). Tras 24 horas de incubación, se retiraron las muestras de los pocillos aplicadas el día anterior y se realizó un lavado de los pocillos con 100 μl por pocillo de PBS 1x.

Después se aplicaron 50 μ l por pocillo de sustrato de hexosaminidasa y se incubaron las placas durante 3 horas. La reacción se detuvo al aplicar 80 μ l por pocillo de la solución de revelado de la hexosaminidasa. Los pocillos con alto contenido de células viables se volvieron inmediatamente amarillos. Finalmente se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a una densidad óptica (absorvancia) de 410 nm.

4.7.5.8 Ensayo de migración celular

Para los ensayos de migración e invasión se utilizó una placa receptora y una placa con *transwells*. La placa receptora (Corning HTS Transwell-96 well accessory plate; Corning Life Science, Corning, NY) es una placa compuesta de 96 pocillos dónde aplicamos las muestras a estudio. Esta placa receptora puede ser opaca o de plástico transparente siempre y cuando sea compatible con lecturas de fluorescencia (debe ser un plástico que no emita autofluorescencia). La placa con *transwells* (Corning HTS Transwell-96 well Permeable Support; Corning Life Science, Corning, NY) es una placa que contiene 96 *transwells* y que encajan en los 96 pocillos de la placa receptora (figura 15). Los *transwells* son pocillos que se caracterizan por tener una membrana porosa en su base inferior con un tamaño de poro determinado. De esta manera, los poros pequeños (inferior a 1 μ m) permiten el paso de moléculas en solución pero no células, y los poros de tamaños mayores (3-8 μ m) permitirán el paso de células dependiendo de su tamaño. Se colocaron las células en los *transwells* y sólo traspasaron la membrana porosa aquellas células con capacidad migratoria (tamaño del poro de los *transwells*: 8 μ m). La lectura de la reacción colorimétrica realizada en las placas receptoras detectó aquellas células vivas que migraron de los *transwells* a la placa receptora.

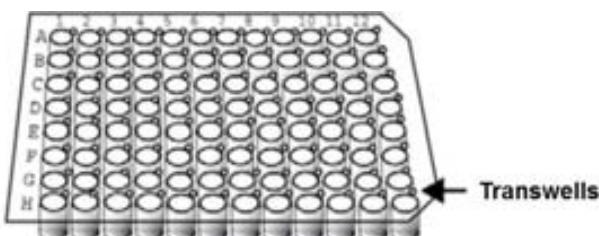


Figura 15. Representación de una placa con *transwells*.

Los ensayos de migración fueron realizados con la línea celular MDA-MB-231. El protocolo general del ensayo de migración es el siguiente (figura 16).

Previo al inicio del ensayo se realizó un pase de células con cambio de medio (apartado 4.5.7.2) a una concentración celular de 1×10^5 células por pocillo de MDA-MB231.

Veinticuatro horas más tarde, se realizó un lavado con PBS y se añadió a las células IMDM con ITS pero sin suplemento de FBS. A este proceso se le llama “starving” o dejar las células “hambrientas” (sin FBS) durante 24 horas en la incubadora. De esta manera, cuando las células estén dentro de los *transwells*, también sin FBS, y se pongan en contacto con el medio de cultivo del pozo de la placa receptora, si éste contiene FBS entonces se establecerá un gradiente de aquellas moléculas del suero que actúan como atrayentes celulares y se facilitará la migración direccional desde el *transwell* hacia el pozo de la placa receptora.

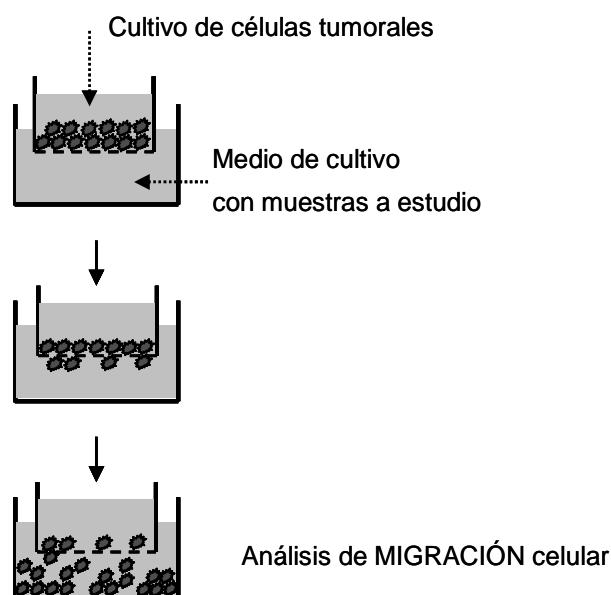


Figura 16. Representación esquemática del ensayo de migración in vitro con células MDA-MB231 al aplicar muestras de suero y líquido peritoneal.

El tercer día del ensayo se sembraron las células en la placa de *transwells* y se colocaron las muestras de suero o líquido peritoneal en la placa receptora. Para preparar las células, el primer paso fue retirar el medio IMDM sin FBS de los

frascos. Tras un lavado con PBS se disgregaron las células, en este caso, con Accutase Solution (Life Technologies, Paisey, UK) que se dejó actuar en la incubadora durante 5 minutos. Esta solución de disgregación celular está recomendada por el fabricante de los *transwells*, ya que la tripsina es muy agresiva y puede entorpecer la migración. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo con medio fresco IMDM sin FBS. Se realizó el contejo celular en la cámara de Neubauer y se sembraron las células a una densidad de 0.5×10^5 células por pocillo en la placa de *transwells* que se introdujo en la placa receptora que contenía las muestras. En paralelo, en la placa receptora se depositaron 100 µl por pocillo de las muestras a estudio según la placa diseñada para cada experimento (figura 14). A su vez, se prepararon las muestras de los controles positivos (diferentes diluciones conocidas de MDA-MB231 en los pocillos de los *transwells* y medio IMDM con FBS en los pocillos de la placa receptora) y los controles negativos (medio sin células en los *transwells* y medio con FBS en la placa receptora). Además, en los ensayos de migración e invasión, se añadieron unos pozos que contenían células en los *transwells* y medio IMDM con y sin FBS en los pocillos de la placa receptora. De esta manera, se pudo determinar los niveles de referencia de migración pasiva de las células (sin FBS) y la migración inducida por el propio FBS del medio de cultivo.

Después de una incubación de 24 horas, se retiraron las muestras de la placa receptora y se lavaron los pocillos con 100 µl por pocillo con el tampón D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Invitrogen) que contiene calcio y magnesio para preservar la adhesión de las células durante el lavado. Posteriormente, se añadieron 100 µl de una solución de disociación celular en los pocillos de la placa receptora (Cell Dissotiation Solution; AbBcn. Trevigen). En este momento, se vaciaron los pocillos de la placa de *transwells* y se introdujo de nuevo la placa de *transwells* en la placa receptora con la finalidad de poner en contacto las células que habían migrado hasta la cara inferior del *transwell* con la solución de disociación. Acto seguido, se realizó una incubación de una hora, incluyendo un paso que consistió en golpear la placa con la punta de los dedos en mitad de la incubación para facilitar el desprendimiento de las células que

estuviesen siendo disociadas en la cara inferior del *transwell*. Tras 1 hora de incubación, se extrajo la placa de *transwells* con cuidado de no agitarla, de tal manera que las células que hubieran migrado estuvieran ahora en suspensión dentro de los pozos de la placa receptora. Para iniciar el ensayo enzimático, se añadieron 100 µl por pocillo de sustrato de hexosaminidasa 2x. La reacción colorimétrica se leyó tras añadir 160 µl por pocillo de solución de revelado de la hexosaminidasa tras un periodo de incubación de 4 horas con el sustrato. La lectura de la placa receptora con las células migradas desde los *transwells*, se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda (absorvancia) de 410 nm.

4.7.5.9 Ensayo de invasión celular

Los ensayos de invasión celular fueron realizados con la línea celular SW620. Se seguió el mismo protocolo que en el ensayo de migración con la diferencia de que la membrana porosa de los *transwells* fue recubierta por una capa de membrana basal que simula el ambiente del tejido conjuntivo (figura 15). Esta membrana constituye una barrera adicional para que las células puedan traspasar el *transwell*, de tal manera que sólo podrán hacerlo aquellas células con capacidad de degradar el extracto de membrana basal y desplazarse a través de ella; es decir, con capacidad invasiva.

La membrana basal incorporada a los *transwells* se constituyó con un extracto de membrana basal ya preparada comercialmente (BME, Basement Membrane Extract; Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, USA) diluída con una solución de tampón de recubrimiento (Coatting Buffer; Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, USA). Previamente a los ensayos, se hicieron pruebas de puesta a punto para determinar la cantidad de membrana basal y su concentración óptima en relación a la capacidad invasiva basal de las células SW620 (sin tratamiento). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 35 µl de membrana basal a una concentración 0,5x respecto a la solución concentrada comercial.

También en unos experimentos preliminares se detectó que al suplementar la solución de células SW620 con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) se obtuvo

una mayor respuesta de la capacidad invasiva por efecto del FBS del medio de cultivo. Añadir PMA fue una condición óptima para poner de manifiesto la actividad invasiva de las células SW620. Por ello todos los experimentos de invasión con la línea SW620 fueron realizados en presencia de PMA 200 nM, tanto en controles como en cultivos tratados.

El protocolo del ensayo de invasión celular fue igual al de migración excepto por la línea celular empleada y por la presencia de membrana basal en los *transwells*. Brevemente, se sembró la línea celular SW620 en medio de cultivo DMEM con 10% de FBS a densidad 1×10^5 células por pocillo. A las 24 horas de incubación se dejaron las células sin FBS (*starving*), añadiéndoles IMDM suplementado con ITS, 24 horas más. Al día siguiente, se colocaron las muestras a estudio en los pocillos de la placa receptora previamente diluidos al 10% con IMDM y filtrados (en el caso de los líquidos peritoneales). En paralelo, se retiró el medio IMDM de los frascos de cultivo dónde crecían las células y se disgregaron con solución Accutase. La suspensión celular obtenida tras añadirle el PMA fue sembrada a una densidad de 1×10^5 células por pocillo en una placa de transwells que contenía la membrana basal. Finalmente, se introdujo la placa de transwells en la placa receptora que contenía las muestras. Después de 24 horas, se realizó el ensayo de hexosaminidasa para determinar el número de células que habían invadido la membrana basal de los *transwells* y se habían depositado en el fondo de los pocillos de la placa receptora (figura 17). Siguiendo los mismos pasos descritos en el ensayo de migración se realizó la lectura de las placas en el espectrofotómetro.

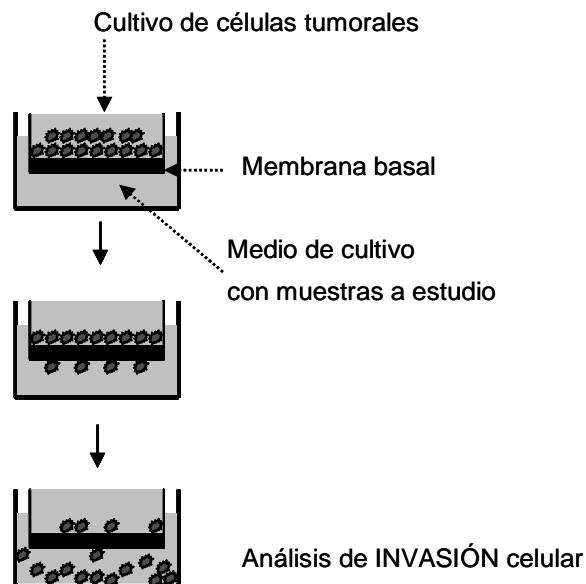


Figura 17. Representación esquemática del ensayo de invasión in vitro con células SW620 al aplicar muestras de suero y líquido peritoneal.

4.8 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron en forma de media (y desviación estándar, DE) si seguían una distribución normal o mediana (y rango intercuartil) si no tenían una distribución normal. Las variables cualitativas se expresaron en frecuencias y porcentajes.

Las variables cuantitativas se han comparado mediante la prueba de la T de Student o el test no paramétrico de Wilcoxon, cuando la variable no seguía una distribución normal. Las variables categóricas se han comparado mediante el test de chi-cuadrado. Para valorar el grado de asociación entre variables, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y se aplicó la correlación de Spearman para las variables no paramétricas.

Los análisis bivariados se realizaron con el análisis proporcional de Cox para estudiar la asociación entre variables clínico-patológicas, resultados de los ensayos in vitro e infección peritoneal, y para estimar la asociación entre las diferentes variables y la recurrencia de la enfermedad.

El análisis de supervivencia se calculó con el método de Kaplan-Meier y el análisis estadístico para comparar los grupos fue el test de Log-Rank.

Una $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa. Todos los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

4.9 Aspectos éticos

El presente proyecto de investigación siguió los principios éticos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Este proyecto fue presentado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital del Mar.

A todos los pacientes incluidos en este estudio se les proporcionó una Hoja de Información (ANEXO 1) y una Hoja de Consentimiento Informado (ANEXO 2). Aquellos pacientes que no firmaron el consentimiento informado no fueron incluidos en el estudio. Así mismo, todos los datos generados en este estudio fueron y serán tratados de forma confidencial según la legislación vigente.

4.10 Aspectos de financiación

El presente estudio se ha realizado con la ayuda de una beca del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) concedida en el 2012 con un periodo de duración de tres años, con número de registro PI11/01093 y como investigador principal el Dr. Miguel Pera.

La autora de la tesis obtuvo una beca competitiva, Ayudas de Investigación Jordi Gras para Residentes del Parc de Salut Mar entre Agosto 2011 y Julio 2012.

5 RESULTADOS

5.1 Características de los pacientes, del tumor y resultados perioperatorios.

Entre enero de 2008 y marzo de 2012 se diagnosticaron en nuestro hospital 420 pacientes de CCR con indicación de cirugía con intención curativa, que no presentaron ninguno de los criterios de exclusión (ver apartado 4.2.2). Estos fueron los pacientes elegibles para el estudio.

Cuarenta y siete pacientes presentaron una infección órgano-espacio postoperatoria, lo que representa un 11,2% del total de pacientes. En 34 pacientes se trató de una peritonitis secundaria a una dehiscencia de anastomosis y los otros 13 pacientes presentaron un absceso intrabdominal. Estos pacientes fueron incluidos en el grupo infección (figura 18). Para constituir el grupo control se seleccionaron 47 pacientes que no presentaron ninguna complicación postoperatoria y fueron apareados con los pacientes del grupo infección por siete variables (ver apartado 4.2.3).

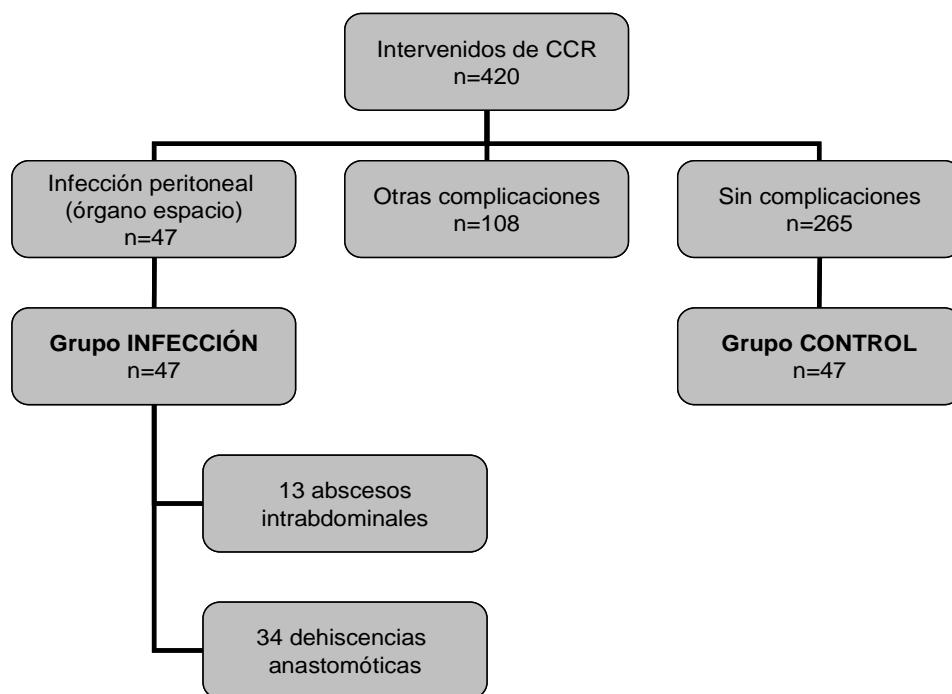


FIGURA 18: Diagrama de flujo de la inclusión de pacientes en el presente estudio.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes de cada uno de los grupos se muestran en la tabla 4. Podemos observar, por el propio diseño del estudio, que no hubo diferencias entre grupos en la edad media ni el sexo de los pacientes, así como tampoco en la localización del tumor. El porcentaje de pacientes con categoría ASA (*American Society of Anesthesiologists*) 3 y 4 fue mayor en el grupo infección, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística. Tampoco observamos diferencias entre los niveles del antígeno carcinoembrionario (CEA) preoperatorios entre grupos. En relación a los pacientes con cáncer de recto, se administró tratamiento neoadyuvante en 5 pacientes de cada grupo.

Tabla 4: Características de los pacientes del estudio.

	Grupo Control (n=47)	Grupo Infección (n=47)	P
Edad (años); x±DE	72 ± 9	74 ± 9	
Sexo (hombres); n(%)	33(70)	33 (70)	
Categoría ASA; n(%)			
- 2	19 (40,4)	10(21,4)	0,195
- 3	26 (55,5)	32(68)	
- 4	2 (4,3)	5(10,6)	
Localización del tumor			
Colon Derecho	18 (38)	18 (38)	
Colon Izquierdo	15 (32)	15 (32)	
Recto	14 (30)	14 (30)	
CEA preoperatorio (ng/dl) x±DE	10 ± 11	11 ± 33	0,893

En la tabla 5 se observan las características perioperatorias en ambos grupos. La resección del tumor se realizó por laparoscopia en 10 pacientes de cada grupo, otra de las variables de aparentamiento. No encontramos diferencias ni en el tiempo operatorio ni en la necesidad de transfusión perioperatoria.

Veinte y cinco (53%) pacientes del grupo infección precisaron una reintervención quirúrgica, en todos los casos por peritonitis secundaria a una dehiscencia de la

anastomosis. Los otros 22 pacientes del grupo infección fueron tratados con éxito con antibióticos y drenaje percutáneo. Tres pacientes del grupo infección fallecieron en los 30 días siguientes a la intervención quirúrgica por complicaciones postoperatorias. Como era de esperar, la estancia postoperatoria de los pacientes que presentaron una infección peritoneal fue significativamente más prolongada que los que no presentaron complicación alguna.

Tabla 5: Características perioperatorias relacionadas con la intervención quirúrgica.

	Grupo Control (n=47)	Grupo Infección (n=47)	P
Abordaje laparoscópico; n(%)	10 (21)	10 (21)	
Tiempo operatorio (min); $x \pm DE$	194 ± 78	204 ± 89	0,734
Transfusión sanguínea; n(%)	5 (11)	6 (13)	1,000
Reoperación; n(%)	0 (0)	25 (53)	0,001
Estancia hospitalaria (días); $x \pm DE$	7 ± 8	25 ± 11	0,001

La tabla 6 muestra la distribución de los pacientes según el estadio tumoral, otra de las variables de aparentamiento. En la mayoría de los pacientes el grado de extensión correspondía a los estadios II y III. La cirugía fue R0 en todos los pacientes de los dos grupos. No observamos diferencias significativas en el número de ganglios identificados entre los grupos. Tampoco encontramos diferencias significativas en otras características anatomo-patológicas del tumor, como el grado de diferenciación celular o la presencia de invasión linfovascular o perineural.

Tabla 6: Características anatomo-patológicas de los tumores en ambos grupos.

	Grupo Control (n=47)	Grupo Infección (n=47)	P
Estadio tumoral; n(%)			
- Estadio I	7 (15)	7 (15)	
- Estadio II	20 (42,5)	20 (42,5)	
- Estadio III	20 (42,5)	20 (42,5)	
Número de ganglios identificados; x±DE	23 ± 15	22 ± 14	0,559
Grado de diferenciación; n(%)			
- Bajo grado	35 (74)	33 (70)	
- Alto grado	12 (26)	14 (30)	0,646
Invasión linfovascular; n(%)	20 (42)	15 (32)	0,289
Invasión perineural; n(%)	15 (32)	11 (23)	0,358

No hubo diferencias significativas en la administración de quimioterapia adyuvante entre los dos grupos del estudio (grupo control: 21 (44%) pacientes vs. grupo infección: 15 (31%) pacientes; p=0,134).

5.2 Resultados de los ensayos ELISA (IL-6 y VEGF)

Se determinó la concentración de las citoquinas IL-6 y VEGF como marcadores de inflamación y angiogénesis, respectivamente, en las muestras de suero extraídas a los pacientes en el cuarto día del postoperatorio (grupo control) o el día que presentaron la infección peritoneal (grupo infección).

5.2.1 Respuesta inflamatoria sistémica (IL-6)

La concentración de IL-6 postoperatoria en suero fue significativamente mayor en aquellos pacientes que presentaron una infección peritoneal en comparación con la de aquellos pacientes que no presentaron ninguna complicación postquirúrgica

(grupo control: 20,7 pg/ml [-15,5 – 60,3] vs. grupo infección: 83,7 pg/ml [24 – 337,1]; P=0,002) (figura 19).

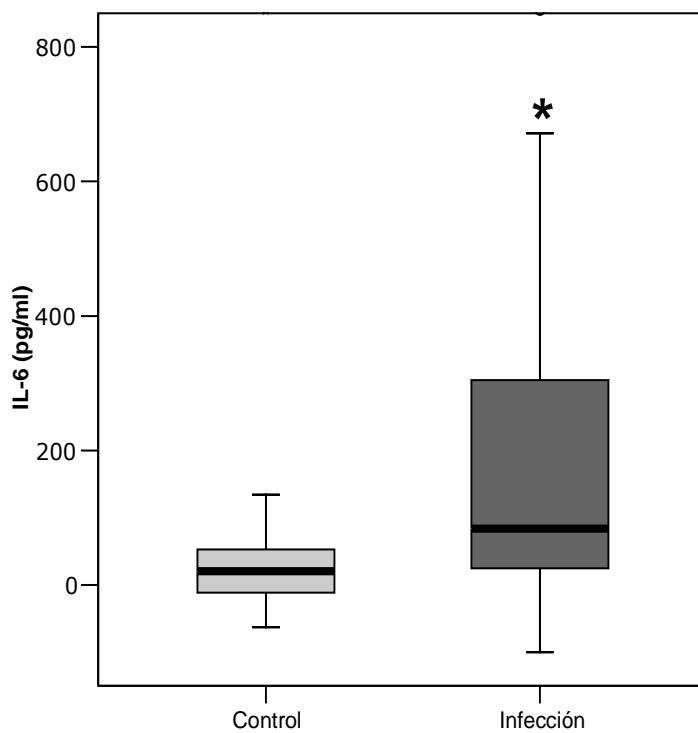


Figura 19. Valores de IL-6 (pg/ml) en las muestras de suero del 4º día postoperatorio del grupo control y del día de la infección (* P<0,05).

Al analizar con detalle los pacientes del grupo infección, no se hallaron diferencias en la respuesta inflamatoria sistémica entre los pacientes que presentaron una peritonitis secundaria a una dehiscencia anastomótica y los que presentaron un absceso intrabdominal (106,1 pg/ml [32,0 – 465,72] vs. 50 pg/ml [4,9 – 109,3]; P=0,127). En cambio, cuando se compararon aquellos pacientes que precisaron una nueva intervención quirúrgica para tratar la infección postoperatoria con los pacientes que fueron tratados con antibioticoterapia y drenaje percutáneo, se observó que la concentración de IL-6 en suero fue significativamente más elevada en aquellos pacientes que fueron reintervenidos (257,4 pg/ml [43 – 546,9] vs. 49,9 pg/ml [20,2 – 106,7]; P=0,030).

5.2.2 Respuesta angiogénica sistémica (VEGF)

Los niveles de citoquina angiogénica VEGF postoperatorios en suero también fueron más elevados en aquellos pacientes que presentaron una infección peritoneal en el postoperatorio cuando se compararon con aquellos pacientes que no presentaron ninguna complicación postquirúrgica. En este caso, la diferencia entre los grupos también fue estadísticamente significativa (grupo control: 697,8 pg/ml [422,5 – 1.036,0] vs. grupo infección: 1.145,5 pg/ml [706,3 – 1.746,5]; P<0,001) (figura 20).

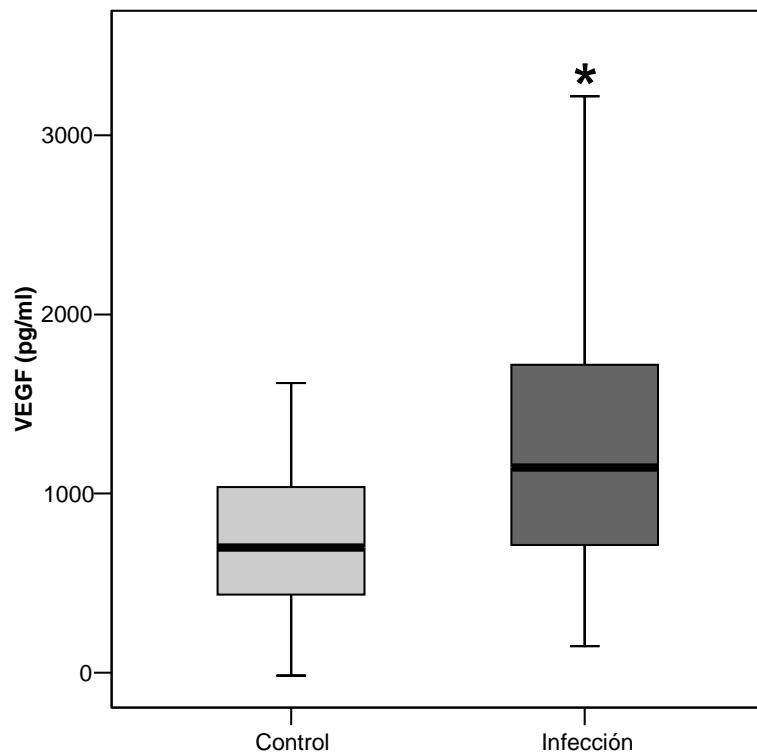


Figura 20. Valores de VEGF (pg/ml) en las muestras de suero del 4º día postoperatorio del grupo control y del día de la infección (* P<0,05).

Cuando se analizaron únicamente los pacientes con una infección peritoneal, no se hallaron diferencias significativas en la concentración postoperatoria de VEGF entre aquellos que presentaron una peritonitis en comparación con los que presentaron un absceso intrabdominal (1.273,5 pg/ml [806,4 – 2.168,4] vs. 1.029,5 pg/ml [564,9 – 1.403]; P=0,177). Tampoco se encontraron diferencias entre aquellos que precisaron de una reintervención respecto los que se trataron

con antibioticoterapia y drenaje percutáneo (1.077,2 pg/ml [779,4 – 1.774] vs. 1.241,5 pg/ml [642,9 – 1.801,6]; P=0,732).

5.3 Resultado de arrays de anticuerpos

Se analizó el patrón de expresión de 43 citoquinas inflamatorias y/o angiogénicas en los sueros extraídos en el postoperatorio de ambos grupos. Debido a la extinción de algunas muestras, el análisis de arrays de anticuerpos se realizó en un total de 45 parejas.

Los resultados normalizados mostraron que las concentraciones de todas las citoquinas angiogénicas y/o inflamatorias analizadas estaban significativamente más elevadas en el grupo infección respecto al control (tabla 7).

Tabla 7: Análisis de 43 citoquinas inflamatorias y angiogénicas en ambos grupos (unidades arbitrarias; todas las variables se compararon tras realizar transformación logarítmica).

CITOQUINAS	Grupo Control (N=45)	Grupo Infección (N=45)	P
Angiogenina	6,96 ± 2,8	9,05 ± 2	<0,001
EGF	5,63 ± 2,7	7,78 ± 2,2	<0,001
ENA-78	2,45 ± 2,9	4,66 ± 2,3	<0,001
b FGF	1,64 ± 3,3	3,75 ± 2,8	0,002
GRO	3,96 ± 2,7	5,72 ± 2,9	0,004
INF-γ	1,34 ± 3,8	3,58 ± 3,1	0,005
IGF-I	1,89 ± 3,2	3,51 ± 2,6	0,006
IL-6	2,56 ± 2,1	4,92 ± 2,1	<0,001
IL-8	2,54 ± 3,7	4,77 ± 3,4	0,003
Leptina	3,41 ± 3,3	5,73 ± 2,5	0,001
MCP-1	3,50 ± 2,9	6,19 ± 2,6	<0,001
PDGF-BB	3,69 ± 2,7	5,99 ± 2,2	<0,001
PIGF	2,46 ± 3,1	4,04 ± 2,8	0,013
RANTES	6,36 ± 2,5	8,16 ± 2,1	0,001
TGF-β1	2,89 ± 2,8	4,99 ± 2,4	<0,001

TIMP-1	5,51 ± 2,7	7,70 ± 2,3	<0,001
TIMP-2	5,44 ± 2,6	7,53 ± 2,2	<0,001
Trombopoietina	2,72 ± 2,8	4,64 ± 2,7	<0,001
VEGF	1,49 ± 3,5	4,21 ± 2,4	<0,001
VEGF-D	2,23 ± 3,3	4,41 ± 2,7	<0,001
Angiopoietina-1	1,30 ± 3,3	3,40 ± 3,3	0,002
Angiopoietina-2	2,65 ± 2,8	5,07 ± 2,5	<0,001
Angiostatina	3,48 ± 2,8	5,58 ± 2,2	<0,001
Endostatina	1,92 ± 3,7	4,95 ± 2,2	<0,001
G-CSF	-0,35 ± 3,9	2,42 ± 3,5	<0,001
GM-GSF	0,42 ± 3,7	2,97 ± 2,8	<0,001
I-309	1,49 ± 2,6	3,36 ± 2,9	0,002
IL-10	0,60 ± 3,4	2,59 ± 3,4	0,005
IL-1α	3,26 ± 2,7	5,24 ± 2,2	<0,001
IL-1β	3,46 ± 2,7	5,30 ± 2,2	<0,001
IL-2	1,96 ± 3,4	4,31 ± 2,3	<0,001
IL-4	0,84 ± 3,9	3,69 ± 2,7	<0,001
I-TAC	1,89 ± 3	3,96 ± 2,8	0,001
MCP-3	-0,15 ± 4,1	2,53 ± 3,4	0,003
MCP-4	0,64 ± 3,8	3,69 ± 2,4	<0,001
MMP-1	3,62 ± 2,6	5,58 ± 2,3	<0,001
MMP-9	5,13 ± 2,6	6,97 ± 2,1	0,001
PECAM-1	2,77 ± 2,7	5,03 ± 2,2	<0,001
Tie-2	2,50 ± 2,8	4,75 ± 2,2	<0,001
TNF-α	2,41 ± 2,4	4,58 ± 2,6	<0,001
u PAR	3,24 ± 2,9	5,36 ± 2,4	<0,001
VEGF R2	4,34 ± 2,6	5,76 ± 2,1	0,006
VEGF R3	4,12 ± 2,8	5,79 ± 2,4	0,001

Dada la variabilidad de los resultados obtenidos, se decidió realizar un análisis relativo entre los valores de citoquinas aumentados en los pacientes infectados

respecto a sus controles; en vez de considerar sus valores absolutos. De esta manera, analizamos las citoquinas que se habían duplicado y también las que se habían inducido más de 100 veces en cada infectado respecto a su control (figura 21). Se observó una gran variabilidad de expresión de citoquinas entre las parejas, así como una gran variabilidad en la magnitud de la inducción.

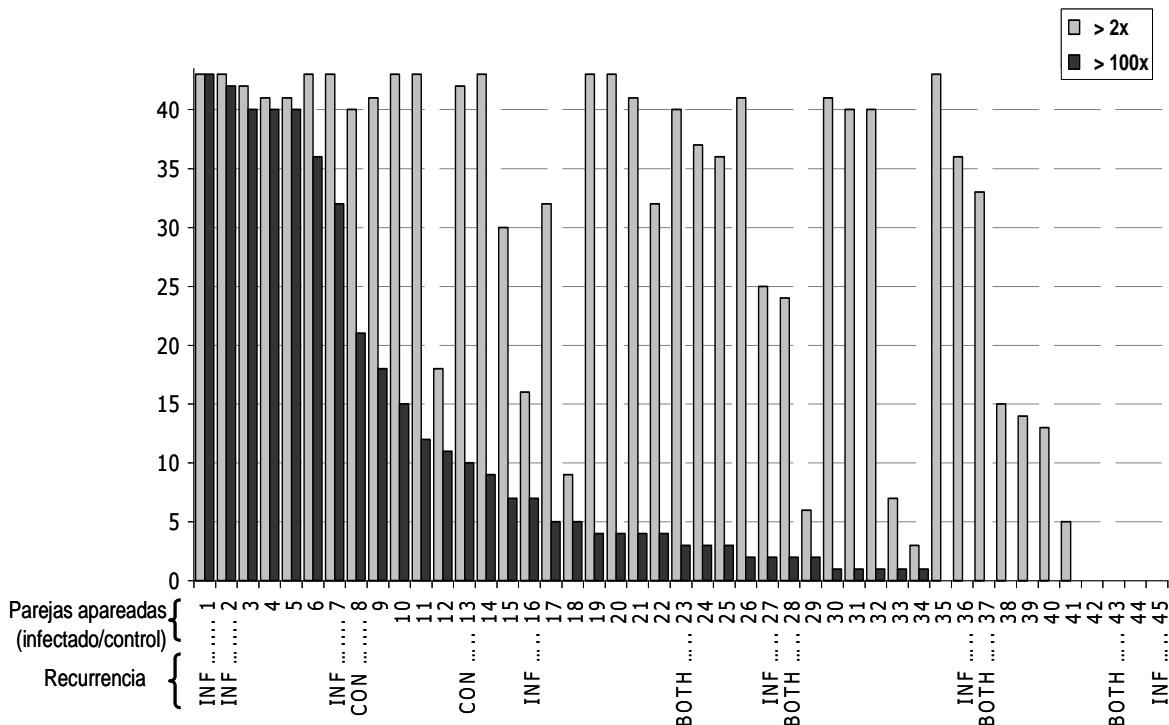


Figura 21. Relación entre el número de citoquinas inducidas más de 2 veces (barras gris claro) o más de 100 veces (barra gris oscuro) en cada pareja de pacientes, concretamente entre el paciente infectado respecto a su control apareado. Se muestra también aquellas parejas donde el paciente infectado (INF) o control (CON) o ambos (BOTH) presentaron una recurrencia tumoral.

5.4 Resultados de los ensayos de proliferación, migración e invasión

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación, migración e invasión al tratar líneas celulares tumorales con muestras de suero o líquido peritoneal de los pacientes de ambos grupos. Se han utilizado muestras preoperatorias o basales y muestras postoperatorias obtenidas en el 4º día postoperatorio en los controles o en el día del diagnóstico de la infección peritoneal, en el grupo infección.

Los resultados finales fueron normalizados como porcentaje respecto al valor preoperatorio de la muestra control; es decir, los resultados se expresan como número relativo de células respecto el número de células detectadas con la muestra preoperatoria del control. De esta manera, se asegura que la comparación de los resultados obtenidos entre las diferentes placas de los ensayos in vitro es correcta mediante el test no paramétrico de Wilcoxon.

Se compararon los resultados de las muestras preoperatorias así como las muestras postoperatorias entre grupos. Estos resultados vienen representados por histogramas. Posteriormente, se analizaron los resultados preoperatorios y postoperatorios de cada uno de los grupos. Finalmente, se calcularon las diferencias en la capacidad de proliferación, migración e invasión entre las muestras preoperatorias y postoperatorios dentro de cada grupo; y hemos comparado dichas diferencias entre los grupos. Todos estos últimos resultados se muestran en tablas.

Debido a la falta de recogida de 6 muestras preoperatorias de suero del grupo infección; los resultados que implican estas muestras se analizan sobre un total de 41 muestras, habiéndose pues eliminado del análisis sus parejas control o sus correspondientes muestras postoperatorias según la comparación realizada.

5.4.1 Ensayo de proliferación en suero

- Línea celular MDA-MB-231

Tal como se observa en la figura 22, la capacidad de proliferación celular al aplicar muestras preoperatorias es significativamente menor en el grupo infección respecto al control ($P=0,007$). En cambio, las muestras postoperatorias del grupo infección inducen una mayor proliferación celular que las muestras postoperatorias del grupo control, y esta diferencia también alcanza la significación estadística ($P=0,013$).

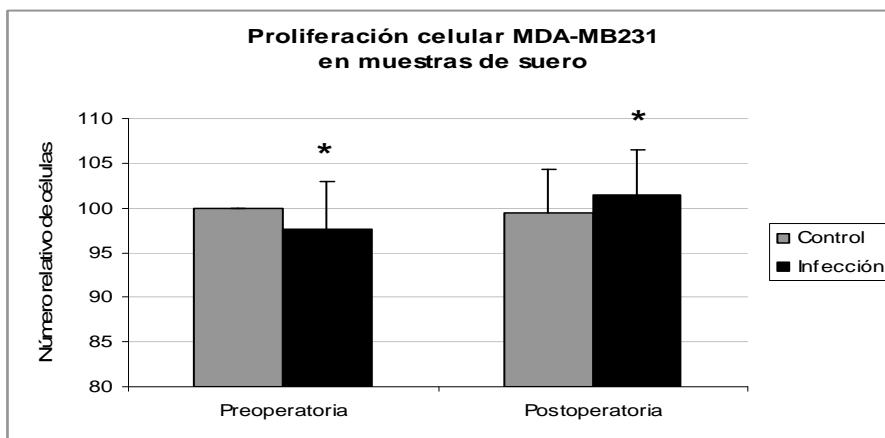


Figura 22: Proliferación celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * $P<0,05$.

Se observó un incremento significativo de la proliferación celular con las muestras postoperatorias del grupo infección que no se detectó con las muestras del grupo control. Al comparar la diferencia entre las muestras postoperatorias y preoperatorias de cada grupo, obtuvimos un aumento significativo de la proliferación celular en el grupo infección (tabla 8). En resumen, se puede concluir que los sueros de pacientes con infección peritoneal postoperatoria inducen un aumento de la proliferación celular en la línea MDA-MB-231 respecto muestras preoperatorias, así como con muestras postoperatorias de suero de pacientes sin complicaciones postoperatorias.

Tabla 8. Proliferación celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (MDA-MB-231) SUERO		Número relativo de células	P
Grupo Control (n=41)	Preoperatoria	100 ± 0	0,425
	4º día	$99,42 \pm 4,9$	
Grupo Infección (n=41)	Preoperatoria	$97,62 \pm 5,4$	0,003
	Día de la infección	$100,33 \pm 5,9$	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=41)	Grupo Control	$-0,30 \pm 5$	0,010
	Grupo Infección	$2,71 \pm 5,5$	

- Línea celular SW620

Se detectó una menor proliferación celular al aplicar muestras de suero preoperatorias del grupo infección al compararlas con las muestras preoperatorias del grupo control ($P=0,019$). Esta diferencia de proliferación celular no se objetivó al comparar las muestras postoperatorias entre grupos ($P=0,362$) (figura 23).

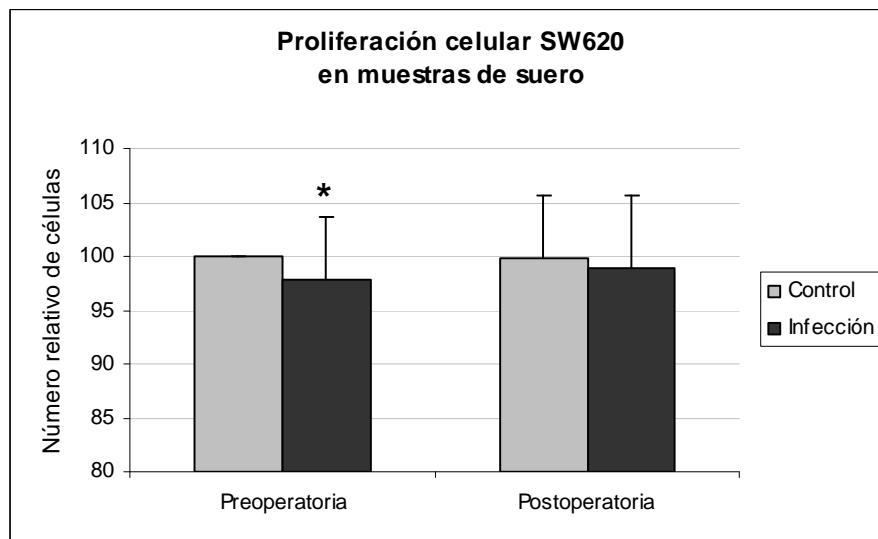


Figura 23: Proliferación celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * $P<0,05$.

No se hallaron diferencias de proliferación celular en la línea celular SW620 al comparar las muestras de suero preoperatorio y postoperatorio en el grupo control ni en el grupo infección. Al igual que sucedía con la línea celular MDA-MB-231, con la línea celular SW620 también se detectó una mayor inducción de la proliferación celular en el grupo infección. Pero en este caso, la diferencia de proliferación entre grupos no alcanza la significación estadística (tabla 9).

Tabla 9. Proliferación celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (SW620)		Número relativo de células	P
SUERO			
Grupo Control (n=41)	Preoperatoria	100 ± 0	0,854
	4º día	99,84 ± 5,8	
Grupo Infección (n=41)	Preoperatoria	97,73 ± 5,9	0,138
	Día de la infección	98,88 ± 6,9	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=41)	Grupo Control	-0,04 ± 5,6	0,216
	Grupo Infección	1,16 ± 4,9	

5.4.2 Ensayo de proliferación en líquido peritoneal

A diferencia de la supervivencia celular (mayor o menor) observada con las muestras de suero, algunas muestras de líquido peritoneal revelaron un efecto citotóxico, es decir, de muerte celular. Este efecto citotóxico se objetivó sólo en muestras postoperatorias de ambos grupos y de forma paralela en ambas líneas celulares. Finalmente, este efecto citotóxico se observó en ambos grupos, obteniendo parejas de muestras con efecto citotóxico sólo en el grupo infección, o en el grupo control o en ambas muestras postoperatorias. A pesar de que se detectó mayor muerte celular en el grupo infección (n=28) que en el grupo control (n=26) esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P>0,1$). Por este motivo, los ensayos de proliferación en ambas líneas celulares con líquido peritoneal sólo se realizaron en un total de 21 parejas para los que incluyeron muestras sólo del grupo control y 19 parejas para los análisis que incluyeron muestras del grupo infección.

- Línea celular MDA-MB-231

No se encontraron diferencias en la proliferación celular entre grupos al comparar muestras preoperatorias ($P=0,582$) ni postoperatorias ($P=0,748$) (figura 24).

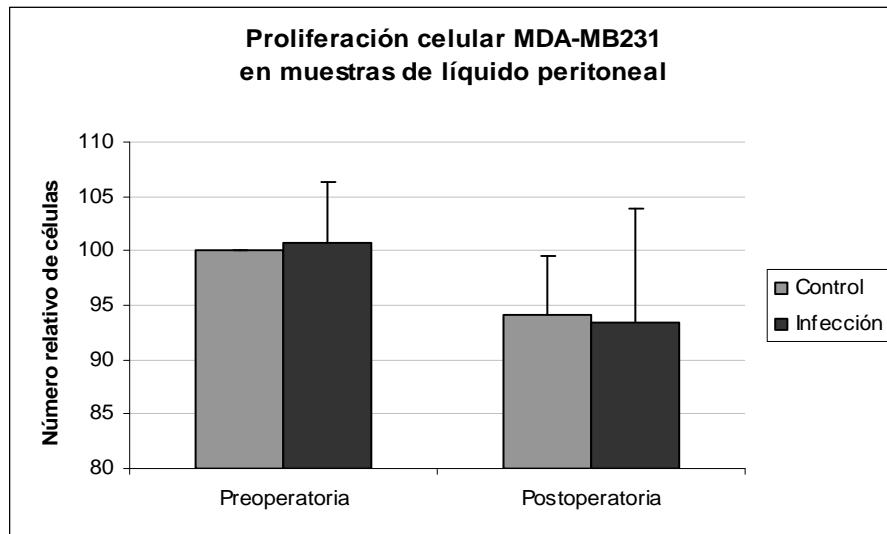


Figura 24: Proliferación celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * P<0.05.

Las muestras postoperatorias de líquido peritoneal mostraron una proliferación celular significativamente menor que las muestras preoperatorias, en el grupo control y en el grupo infección. La actividad proliferativa de la línea celular MDA-MB-231 no es diferente al comparar entre grupos la diferencia entre muestras postoperatorias y preoperatorias (tabla 10).

Tabla 10. Proliferación celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (MDA-MB-231) LÍQUIDO PERITONEAL		Número relativo de células	P
Grupo Control (n=21)	Preoperatoria	100 ± 0	<0,001
	4º día	94,10 ± 5,4	
Grupo Infección (n=19)	Preoperatoria	100,73 ± 5,7	0,016
	Día de la infección	93,93 ± 10,6	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=19)	Grupo Control	-5,82 ± 5,6	0,728
	Grupo Infección	-6,80 ± 11,1	

- Línea celular SW620

Las muestras preoperatorias de líquido peritoneal del grupo infección inducen una mayor proliferación celular que las muestras preoperatorias del grupo control ($P=0,028$). Sin embargo, no se observa una capacidad de proliferación celular significativamente mayor en las muestras postoperatorias del grupo infección ($P=0,245$) (figura 25).

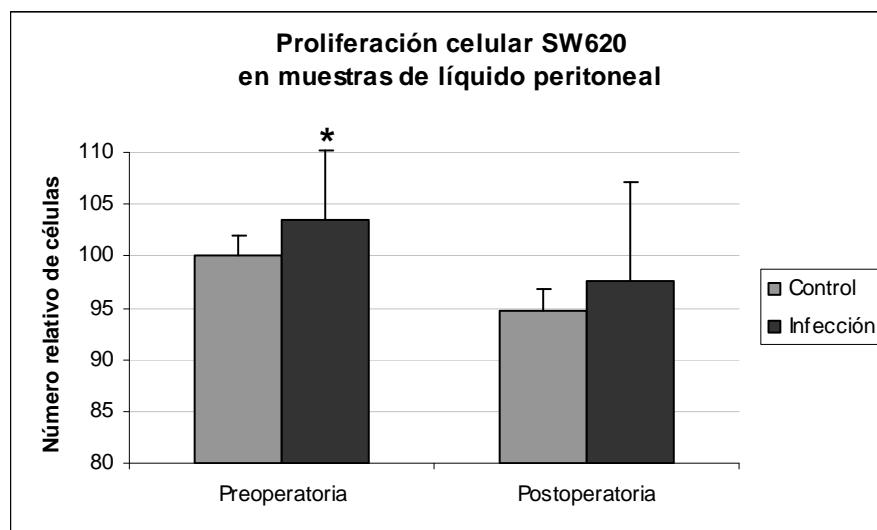


Figura 25: Proliferación celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * $P<0.05$.

Al igual que en la línea celular MDA-MB-231, las muestras postoperatorias de líquido peritoneal aplicadas a la línea celular SW620, mostraron una menor capacidad proliferativa que las muestras preoperatorias en ambos grupos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa tanto en el grupo control como en el grupo infección (tabla 11). Pero no se detectaron diferencias al estudiar las diferencias entre muestras postoperatorias y preoperatorias de ambos grupos.

Tabla 11. Proliferación celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN (SW620)		Número relativo de células	P
LÍQUIDO PERITONEAL			
Grupo Control (n=21)	Preoperatoria	100 ± 0	0,003
	4º día	94,76 ± 7,2	
Grupo Infección (n=19)	Preoperatoria	103,59 ± 6,6	0,017
	Día de la infección	97,03 ± 9,7	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=19)	Grupo Control	-5,39 ± 7,5	0,730
	Grupo Infección	-6,56 ± 10,9	

5.4.3 Ensayo de migración en suero

Al comparar las muestras preoperatorias de suero de ambos grupos, se observó una menor migración de las células MDA-MB-231 en el grupo infección ($P<0,005$). Sin embargo, al comparar las muestras postoperatorias de ambos grupos encontramos una mayor capacidad de migración celular en el grupo infección ($P=0,013$) (figura 26).

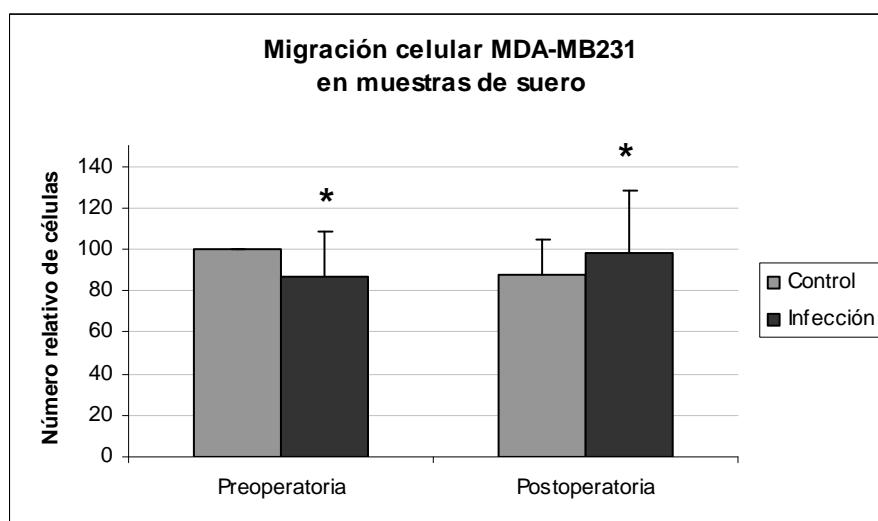


Figura 26: Migración celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * $P<0.05$.

Las muestras postoperatorias de suero del grupo control disminuyen la migración de las células MDA-MB-231 respecto sus muestras preoperatorias, mientras que las muestras postoperatorias del grupo infección inducen un aumento significativo de la migración celular (tabla 12). La diferencia entre muestras postoperatorias y preoperatorias entre grupos, es significativamente mayor en el grupo infección.

Tabla 12. Migración celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENSAYO DE MIGRACIÓN (MDA-MB-231)		Número relativo de células	P
SUERO			
Grupo Control (n=41)	Preoperatoria	100 ± 0	<0,001
	4º día	87,45 ± 17,5	
Grupo Infección (n=41)	Preoperatoria	86,33 ± 21,9	0,006
	Día de la infección	99,7 ± 32,3	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=41)	Grupo Control	-11,27 ± 16,9	<0,001
	Grupo Infección	13,44 ± 29,8	

5.4.4 Ensayo de migración en líquido peritoneal

Debido al efecto citotóxico observado tras aplicar determinadas muestras de líquido peritoneal; los ensayos de migración se realizaron sólo con las parejas de muestras que revelaron supervivencia celular. Los ensayos de migración con líquido peritoneal se realizaron en 38 muestras (19 parejas).

Al comparar las muestras preoperatorias de ambos grupos se detectó una menor capacidad migratoria estadísticamente significativa con las muestras basales del grupo infección ($P=0,009$). En cambio, al comparar las muestras postoperatorias se detectó un aumento de la migración celular en el grupo infección también estadísticamente significativo ($P=0,016$) (figura 27).

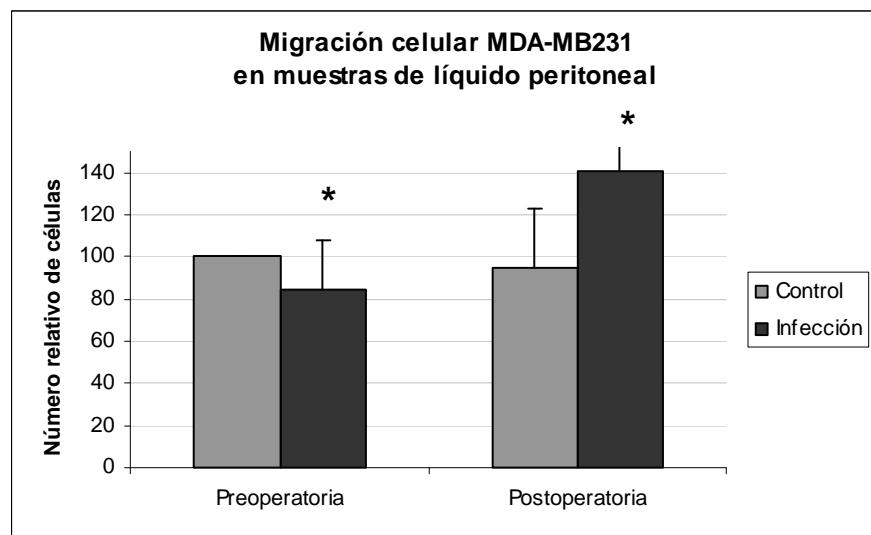


Figura 27: Migración celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * P<0.05.

No se observaron diferencias significativas entre las muestras preoperatorias y postoperatorias del grupo control. Sin embargo, se detectó un aumento significativo de la migración celular en las muestras postoperatorias del grupo infección comparándolas con sus muestras preoperatorias (tabla 13). La inducción de la actividad migratoria entre muestras preoperatorias y postoperatorias del grupo infección fue significativamente mayor que la detectada en el grupo control. De la misma manera que se detectó una mayor migración celular al aplicar suero de pacientes infectados, también fue evidente con muestras de líquido peritoneal.

Tabla 13. Migración celular de la línea MDA-MB-231 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENSAYO DE MIGRACIÓN (MDA-MB-231) LÍQUIDO PERITONEAL		Número relativo de células	P
Grupo Control (n=21)	Preoperatoria	100 ± 0	0,373
	4º día	94,23 ± 29,1	
Grupo Infección (n=19)	Preoperatoria	84,01 ± 23,8	0,009
	Día de la infección	139,6 ± 84,7	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=19)	Grupo Control	-5,65 ± 30,5	0,008
	Grupo Infección	55,59 ± 83,2	

5.4.5 Ensayo de invasión en suero

No se detectaron diferencias significativas en relación a la capacidad invasiva de la línea celular SW620 analizada entre grupos, ni en las muestras preoperatorias ($P=0,291$) ni en las muestras postoperatorias ($P=0,122$) (figura 28).

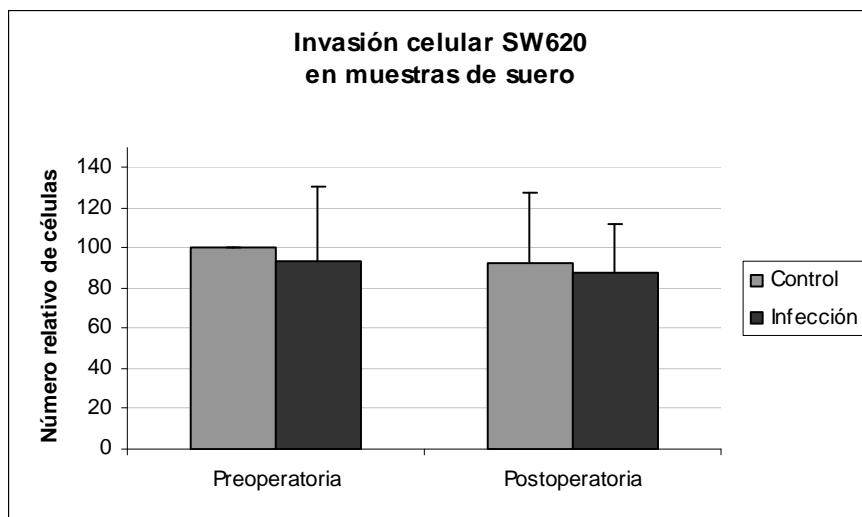


Figura 28: Invasión celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de suero, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

Se observó un descenso de la capacidad invasiva de la línea celular SW620 al tratarlas con muestras de suero obtenidas en el postoperatorio respecto las muestras preoperatorias. Pero solo se alcanzó la significación estadística en el grupo infección (tabla 14). La diferencia entre las muestras postoperatoria y preoperatoria entre grupos no mostró diferencias. En resumen, no se observaron diferencias de inducción invasiva entre grupos al aplicar muestras de suero.

Tabla 14. Invasión celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de suero, basal y del 4º día postoperatorio o del día de la infección si ocurría, en el grupo control e infección.

ENSAYO DE INVASIÓN (SW620) SUERO		Número relativo de células	P
Grupo Control (n=41)	Preoperatoria	100 ± 0	0,170
	4º día	92,94 ± 34,7	
Grupo Infección (n=41)	Preoperatoria	93,97 ± 36,1	0,043
	Día de la infección	86,14 ± 24,1	
Diferencia (entre 4ºdía/día de la infección y preoperatoria) (n=41)	Grupo Control	-9,18 ± 34,1	0,861
	Grupo Infección	-7,82 ± 23,9	

5.4.6 Ensayo de invasión en líquido peritoneal

Al igual que los ensayos de migración, los ensayos de invasión con líquido peritoneal se realizaron en las 19 parejas que mostraron supervivencia celular.

No se detectaron diferencias en la capacidad invasiva de la línea celular SW620 entre las muestras preoperatorias de ambos grupos ($P=0.053$). En cambio, la capacidad invasiva de las muestras postoperatorias del grupo infección fue significativamente mayor que las muestras postoperatorias del grupo control ($P=0.024$) (figura 29).

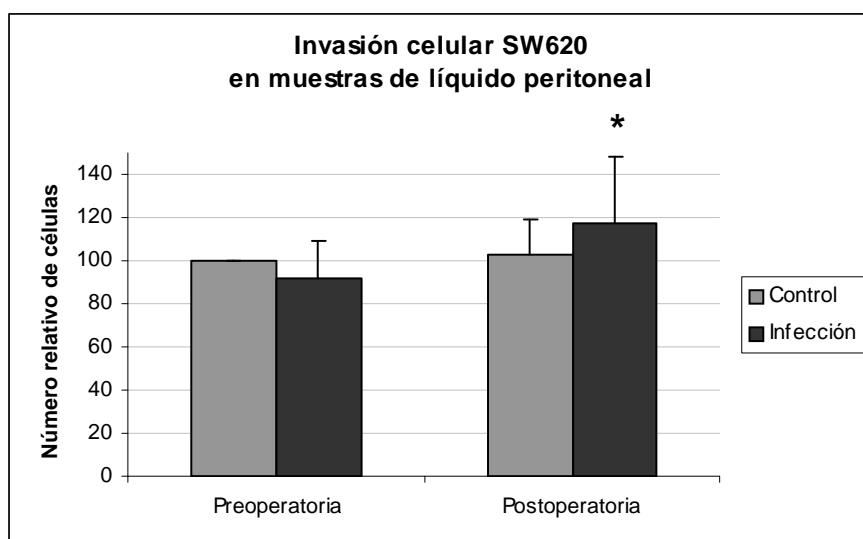


Figura 29: Invasión celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección. * $P<0.05$.

No se observaron diferencias de invasión celular al aplicar muestras de líquido peritoneal preoperatorio y postoperatorio en el grupo control. Pero si observó una mayor inducción de la invasión celular con las muestras postoperatorias del grupo infección (tabla 15). Asimismo, se detectó una mayor capacidad de invasión celular en el grupo infección respecto al control al comparar las diferencias entre muestras postoperatorias y preoperatorias de cada grupo. Esta diferencia alcanzó la significación estadística.

Tabla 15. Invasión celular de la línea SW620 tras aplicar muestras de líquido peritoneal, preoperatorias y postoperatorias, de los pacientes del grupo control e infección.

ENsayo de invasión (SW620)		Número relativo de células	P
LÍQUIDO PERITONEAL			
Grupo Control (n=21)	Preoperatoria	100 ± 0	0,405
	4º día	102,95 ± 15,9	
Grupo Infección (n=19)	Preoperatoria	91,70 ± 17,5	0,043
	Día de la infección	114,71 ± 27,8	
Diferencia (entre 4º día/día de la infección y preoperatoria) (n=19)	Grupo Control	2,81 ± 16,2	0,004
	Grupo Infección	23,01 ± 23,4	

5.5 Estudio de supervivencia y recurrencia tumoral

Excluyendo los 3 pacientes que fallecieron en el postoperatorio inmediato, el número final de pacientes para el análisis de supervivencia y recurrencia es de 91 pacientes. La mediana de seguimiento de estos pacientes fue de 38 meses (25 – 55).

5.5.1 Estudio de supervivencia global y por grupos

Al final del periodo de seguimiento, de los 91 pacientes murieron 23, 9 del grupo control y 13 del grupo infección. La supervivencia global de nuestra muestra fue del 74,7%.

Al comparar las curvas de supervivencia global mediante el test de Log-Rank, se observó que la supervivencia global fue significativamente mayor en los pacientes que presentaron un curso postoperatorio sin complicaciones (grupo control) (figura 30).

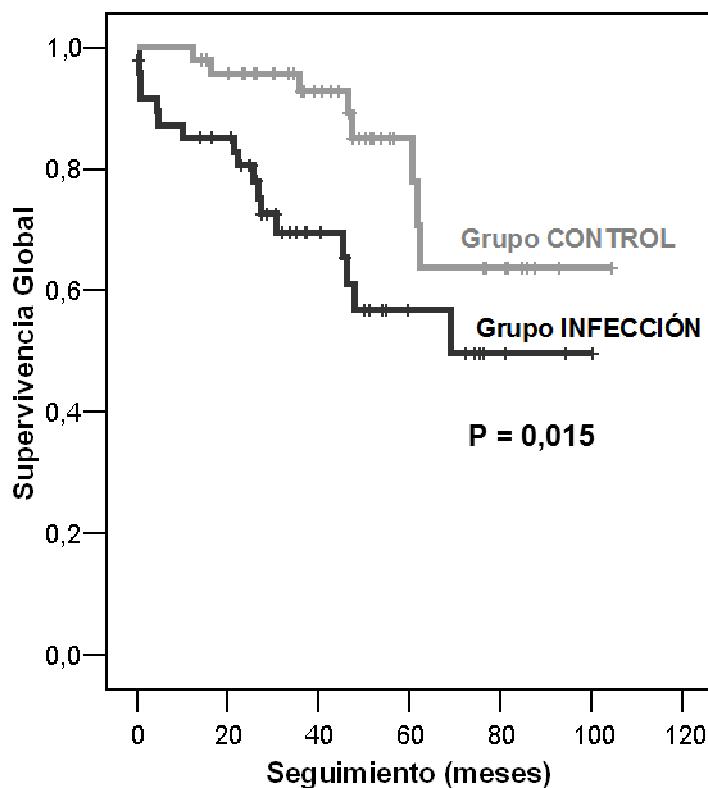


Figura 30: Supervivencia global en cada uno de los grupos.

5.5.2 Estudio de recurrencia global y por grupos

Sobre el total de 91 pacientes a estudio, el número de pacientes que recurrieron al final del seguimiento fue de 18 (19,8%). Seis (12,8%) pacientes del grupo control presentaron una recurrencia en comparación con los 12 pacientes (27,3%) del grupo infección que presentaron una recurrencia local o sistémica ($P=0,001$). Los pacientes con infección peritoneal postoperatoria presentaron mayor porcentaje de recurrencia que los pacientes sin complicaciones postoperatorias.

Tabla 16. Recurrencia local y sistémica por grupos.

RECURRENCIA LOCAL	Grupo Control (n=47)	Grupo Infección (n=44)	P
Si n(%)	1 (2,1%)	2 (4,5%)	0,608
No n(%)	46 (97,9%)	42 (95,5%)	

RECURRENCIA SISTÉMICA	Grupo Control (N=47)	Grupo Infección (N=44)	P
Si n(%)	5 (10,6%)	10 (22,7%)	0,120
No n(%)	42 (89,4%)	34 (77,3%)	

Cuando se analizó el tipo de recurrencia, local o sistémica, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 16). El grupo infección presentó una mayor recurrencia global a expensas de la recurrencia sistémica. Concretamente, 10 de los 12 pacientes del grupo infección que recurrieron, presentaron una recidiva sistémica. Se realizó tratamiento quirúrgico de rescate en dos recidivas hepáticas y una pulmonar. Los 2 pacientes con recurrencia local siguieron un tratamiento paliativo. Por otro lado, de los 6 pacientes del grupo control que recurrieron, 5 presentaron una recidiva sistémica (3 metástasis hepáticas y 2 metástasis pulmonares). Se indicó tratamiento quirúrgico de rescate en 3 de ellos, 2 resecciones hepáticas y una pulmonar).

Al analizar el resultado oncológico por estadios se observó que ningún paciente con estadio I tumoral presentó recurrencia del tumor. No se encontraron diferencias de recurrencia tumoral entre el grupo control e infección en el estadio II (grupo control: 3/18 (16,7%) vs. grupo infección: 6/18 (33,3%); $P=0,443$); ni en el estadio III (grupo control: 3/18 (16,7%) vs. grupo infección: 6/18 (33,3%); $P=0,443$).

Al comparar las curvas de supervivencia libre de enfermedad durante el seguimiento mediante el test de Log-Rank, la supervivencia libre de enfermedad fue significativamente mayor en los pacientes que presentaron un curso postoperatorio sin complicaciones (grupo control) (figura 31).

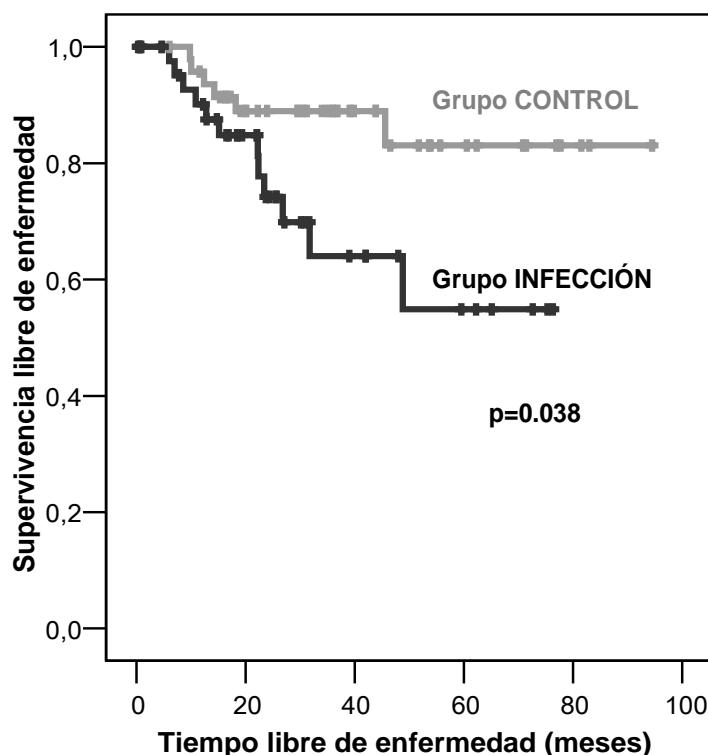


Figura 31: Supervivencia libre de enfermedad en cada uno de los grupos.

La supervivencia libre de enfermedad a los 2 años fue significativamente menor en los pacientes que presentaron una infección peritoneal postoperatoria (grupo infección: 77,6% vs. grupo control 90,6%; $P=0,032$).

5.6 Relación entre variables de los pacientes, del tumor y resultados de los diferentes ensayos con la recurrencia tumoral

A continuación se compararon diferentes variables de los pacientes, del tumor, los valores resultantes de citoquinas obtenidos en los ensayos ELISA y los arrays de anticuerpos y los resultados de los ensayos de proliferación, migración e invasión celular, entre aquellos pacientes que presentaron una recurrencia tumoral (local y/o sistémica) y los que no presentaron recurrencia durante el periodo de seguimiento, independientemente del grupo a estudio.

5.6.1 Variables clínicas de los pacientes

En nuestra muestra de pacientes, no se halló una asociación entre el sexo, la edad, la concentración de CEA preoperatorio y la recurrencia tumoral (tabla 17). La quimioterapia adyuvante tampoco se asoció a una mayor o menor recurrencia tumoral.

Sin embargo, la infección peritoneal postoperatoria se asoció significativamente a una mayor recurrencia tumoral. La razón de riesgo (HR, *hazard ratio*) de recurrencia tumoral de los pacientes con infección peritoneal en comparación con los que no la presentaron fue de 2,954. En otras palabras, el riesgo de padecer una recurrencia tumoral es casi tres veces mayor si se ha sufrido una infección peritoneal postoperatoria.

Tabla 17. Análisis univariado de recurrencia y diferentes variables clínicas.

	HR (IC 95%)	P
Sexo (masculino)	0.570 (0.187 – 1.732)	0.321
Edad	0.996 (0.948 – 1.016)	0.858
CEA preoperatorio	0.997 (0.980 – 1.017)	0.784
Tratamiento Adyuvante	2.029 (0.786 – 5.240)	0.144
Infección Peritoneal	2.954 (1.100 – 7.931)	0.032

5.6.2 Variables anatomo-patológicas del tumor

A diferencia de lo esperado, la afectación ganglionar no se asoció a recurrencia tumoral en el grupo estudiado (tabla 18). En cambio, el número de ganglios identificados se asoció de forma significativa a una menor recurrencia tumoral. El número de ganglios identificados parece ser factor protector de recurrencia tumoral. El grado de diferenciación tumoral y la invasión linfovascular y perineural no se asociaron a recurrencia tumoral.

Tabla 18. Análisis univariado de recurrencia y diferentes variables anatomo-patológicas.

	HR (IC 95%)	P
Afectación ganglionar (si vs. no)	1.298 (0.509 – 3.312)	0.585
Número de ganglio identificados	0.932 (0.870 – 0.998)	0.044
Grado de diferenciación	2.110 (0.816 – 5.459)	0.124
Invasión linfovascular	2.146 (0.849 – 5.421)	0.106
Invasión perineural	1.850 (0.715 – 4.789)	0.205

5.6.3 Resultados de los ensayos ELISA

Se estudió la respuesta inflamatoria (según valores de IL-6) y la respuesta angiogénica (según valores de VEGF) postoperatoria entre aquellos pacientes que presentaron una recurrencia tumoral y los que no la presentaron durante el seguimiento, independientemente de la presencia de infección. La concentración de IL-6 en suero no fue diferente entre los pacientes que recurrieron y los que no. La concentración de VEGF en suero fue mayor en los pacientes que recurrieron casi alcanzando la significación estadística (tabla 19).

Tabla 19. Análisis univariado de recurrencia y resultados de ensayos ELISA.

	HR (IC 95%)	P
IL-6 suero postoperatorio	0,951 (0,763 – 1,186)	0,657
VEGF suero postoperatorio	1,559 (0,973 – 2,499)	0,065

5.6.4 Resultados de los arrays de anticuerpos

También se analizó si existía alguna asociación entre los valores obtenidos de cada citoquina en suero del postoperatorio y la recurrencia tumoral, independientemente del grupo al cual pertenecen los pacientes. Ninguna de las citoquinas mostró una asociación estadísticamente significativa con la recurrencia tumoral (tabla 20).

Tabla 20. Análisis univariado de recurrencia y diferentes citoquinas inflamatorias y/o angiogénicas (todas las variables se han comparado tras realizar transformación logarítmica).

	HR (IC 95%)	P
Angiogenina	1,090 (0,926 – 1,284)	0,298
EGF	1,076 (0,906 – 1,278)	0,402
ENA-78	1,052 (0,896 – 1,234)	0,537
b FGF	1,048 (0,910 – 1,208)	0,511
GRO	1,063 (0,901 – 1,254)	0,469
INF-γ	1,077 (0,954 – 1,215)	0,230
IGF-I	1,051 (0,919 – 1,203)	0,465
IL-6	1,025 (0,839 – 1,251)	0,811
IL-8	0,988 (0,869 – 1,122)	0,847
Leptina	1,051 (0,911 – 1,212)	0,494
MCP-1	1,038 (0,888 – 1,214)	0,637
PDGF-BB	1,110 (0,943 – 1,306)	0,208
PIGF	1,031 (0,891 – 1,192)	0,686
RANTES	1,190 (0,993 – 1,427)	0,059
TGF-β1	1,056 (0,890 – 1,254)	0,532
TIMP-1	1,067 (0,901 – 1,264)	0,451
TIMP-2	1,070 (0,894 – 1,282)	0,459
Trombopoietina	1,051 (0,894 – 1,236)	0,549
VEGF	1,103 (0,968 – 1,258)	0,140
VEGF-D	1,024 (0,886 – 1,183)	0,747
Angiopoietina-1	0,984 (0,853 – 1,134)	0,821
Angiopoietina-2	1,055 (0,895 – 1,244)	0,522
Angiostatina	1,063 (0,896 – 1,261)	0,484

Endostatina	1,087 (0,937 – 1,260)	0,271
G-CSF	1,119 (0,991 – 1,264)	0,071
GM-GSF	1,122 (0,977 – 1,289)	0,103
I-309	1,088 (0,929 – 1,274)	0,296
IL-10	1,020 (0,886 – 1,173)	0,784
IL-1 α	1,041 (0,874 – 1,240)	0,651
IL-1 β	1,049 (0,880 – 1,250)	0,596
IL-2	1,029 (0,884 – 1,198)	0,708
IL-4	1,081 (0,946 – 1,235)	0,254
I-TAC	1,016 (0,861 – 1,197)	0,853
MCP-3	1,050 (0,932 – 1,182)	0,422
MCP-4	1,039 (0,906 – 1,191)	0,585
MMP-1	1,038 (0,872 – 1,235)	0,675
MMP-9	1,047 (0,875 – 1,252)	0,618
PECAM-1	1,059 (0,889 – 1,262)	0,522
Tie-2	1,067 (0,895 – 1,273)	0,469
TNF- α	0,988 (0,891 – 1,191)	0,900
u PAR	1,100 (0,936 – 1,293)	0,248
VEGF R2	1,078 (0,906 – 1,283)	0,398
VEGF R3	1,084 (0,921 – 1,277)	0,330

5.6.5 Resultados de los ensayos in vitro

Finalmente, se analizaron los resultados de actividad proliferativa, migratoria e invasiva de las muestras postoperatorias y la diferencia entre las postoperatorias y preoperatorias; y se compararon entre aquellos pacientes que presentaron una recurrencia tumoral y los que no la presentaron independientemente de la presencia de infección.

- **Muestras del 4º día postoperatorio o del día de la infección**

No se detectó una asociación entre capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 y la recurrencia tumoral, ni al tratar las células con suero ni con líquido

peritoneal. En cambio, se detectó una mayor migración celular en los pacientes que recurrieron, asociación que fue estadísticamente significativa entre la recurrencia tumoral y la migración celular al tratar las células MDA-MB-231 con muestras postoperatorias de líquido peritoneal. La capacidad invasiva de las células SW620 tras aplicarles muestras de suero y líquido peritoneal postoperatorias no se asoció con la recurrencia tumoral (tabla 21).

Tabla 21. Análisis univariado de recurrencia tumoral y capacidad de proliferación en la línea celular MDA-MB-231, de migración en la línea celular MDA-MB-231 y de invasión en la línea celular SW620 al tratarse con muestras postoperatorias.

	HR (IC 95%)	P
Ensayo de proliferación en suero	0,978 (0,886 – 1,081)	0,667
Ensayo de proliferación en líquido peritoneal	0,996 (0,985 – 1,007)	0,491
Ensayo de migración en suero	1,003 (0,982 – 1,025)	0,792
Ensayo de migración en líquido peritoneal	1,016 (1,000 – 1,032)	0,044
Ensayo de invasión en suero	0,984 (0,963 – 1,007)	0,167
Ensayo de invasión en líquido peritoneal	1,024 (0,955 – 1,055)	0,104

- Diferencia entre las muestras postoperatorias (4º día postoperatorio o el día de la infección) con las muestras preoperatorias (basales)**

Los pacientes que presentaron una recurrencia tumoral expresaron un descenso de la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 pero con una inducción de la migración mayor al estudiar las diferencias entre muestras postoperatorias y preoperatorias de líquidos peritoneales que los pacientes que no recurrieron. Estas asociaciones fueron estadísticamente significativas. En cambio, no se detectó una asociación entre recurrencia tumoral y la capacidad de proliferación y migración de las células MDA-MB-231 al tratar las células con suero. La diferencia entre muestras postoperatorias y preoperatorias sobre la capacidad invasiva de las células SW620 tras aplicarles muestras de suero y líquido peritoneal no se asoció con la recurrencia tumoral (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis univariado de recurrencia tumoral y activación o inhibición de la capacidad de proliferación (en la línea celular MDA-MB-231), de migración (en la línea MDA-MB-231) e invasión (en la línea SW620) observada entre las muestras postoperatorias y preoperatorias.

	HR (IC 95%)	P
Ensayo de proliferación en suero	0,948 (0,839 – 1,070)	0,386
Ensayo de proliferación en líquido peritoneal	0,986 (0,973 – 0,999)	0,041
Ensayo de migración en suero	1,010 (0,992 – 1,029)	0,285
Ensayo de migración en líquido peritoneal	1,017 (1,001 – 1,033)	0,034
Ensayo de invasión en suero	1,001 (0,973 – 1,029)	0,955
Ensayo de invasión en líquido peritoneal	1,016 (0,985 – 1,047)	0,317

En definitiva, se puede concluir que los líquidos peritoneales de pacientes con recurrencia tumoral inducen una menor proliferación celular pero una mayor capacidad de migración que los que no recurren.

6 DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral se enmarca en la línea de investigación principal del Grupo de Investigación en Cáncer Colorrectal del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques – Parc de Salut Mar (IMIM-PSMAR), la cual persigue entender los mecanismos de recurrencia tumoral después de una exéresis quirúrgica con intención curativa, en particular de aquellos asociados a la infección peritoneal postoperatoria.

Uno de los primeros objetivos de esta tesis ha sido continuar con la construcción de un banco de muestras de suero y líquido peritoneal, junto con la descripción de los datos clínicos asociados a cada muestra. La relativa baja frecuencia de recurrencia tumoral después de cirugía curativa, especialmente en los estadios I y II, así como la baja frecuencia de dehiscencias anastomóticas, requieren de la realización de un trabajo continuo e integrado a lo largo de los años para disponer de un número suficiente de casos rigurosamente apareados con sus controles. Esta tesis ha sido una parte muy relevante de este trabajo multianual, y los resultados conseguidos muestran en particular, que la magnitud del modelo construido posee ya una potencia estadística razonable.

Otra de las finalidades de la tesis ha sido contribuir a la mejora de nuestro potencial investigador hacia la puesta en marcha de métodos experimentales en biología celular que permitan desarrollar funcionalmente ciertas hipótesis originadas en la clínica. En concreto, los métodos desarrollados han consistido principalmente en el estudio de actividades celulares relacionadas con la biología tumoral utilizando ensayos *in vitro* con líneas tumorales. De esta manera, hemos puesto a punto métodos de estudio – ensayos *in vitro*, protocolos de muestreo adaptados a las técnicas, caracterización molecular de muestras– con la finalidad de identificar mecanismos de regulación relevantes durante el proceso de recurrencia tumoral. Hasta el momento y en el ámbito de los objetivos planteados, el estudio realizado ha permitido concluir que el ambiente inflamatorio en sangre y líquido peritoneal después de una infección postoperatoria está asociado a ciertos

factores solubles, todavía en proceso de identificación, que modifican significativamente la biología celular de las células tumorales. Apoyado por resultados previos del grupo, también se han obtenido resultados que confirman el carácter multifactorial del fenómeno de la recurrencia tumoral. Este hecho enfatiza la importancia de disponer de esta metodología experimental ya que permitirá incorporar nuevos ensayos funcionales para el desarrollo de nuevas hipótesis de trabajo que están surgiendo (ensayos sobre diferenciación celular, expresión génica, metabolómica,...).

De los resultados obtenidos en el presente estudio, existe un resultado principal que proponemos como uno de los posibles mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia tumoral *in vivo*. Demostramos que el medio inflamatorio en suero y líquido peritoneal en respuesta a una infección intraabdominal estimula la capacidad de migración e invasión de líneas celulares tumorales en ensayos *in vitro*. Este ambiente inflamatorio podría ser pues responsable, al menos en parte, de aumentar la diseminación de células tumorales residuales en el lecho quirúrgico, en sangre periférica y en micrometástasis ocultas que eventualmente puedan dar lugar a la recurrencia tumoral.

Las consecuencias de la asociación entre infección intraabdominal postoperatoria y recurrencia tumoral, los mecanismos implicados en dicha asociación, así como su posible utilidad en el seguimiento de los pacientes operados y su continuidad en nuestro grupo de investigación se discuten en los siguientes apartados.

6.1 Resultados de las variables clínicas de los pacientes, anatómopatológicas del tumor y perioperatorias.

La definición de dehiscencia anastomótica ha sido motivo de revisiones sistemáticas (158, 159) debido a que no existe una definición consensuada y estandarizada. En la revisión de Bruce et al (158) se describen hasta 29

definiciones diferentes. Los signos y síntomas más frecuentemente descritos son: signos de peritonitis local o generalizada, salida de material fecal o purulento a través de un drenaje, de la herida o del ano, un absceso intraperitoneal y la presencia de fiebre. En la mayoría de los estudios de esta revisión se utilizó una prueba de imagen con contraste hidrosoluble para confirmar la sospecha clínica de dehiscencia anastomótica. Para intentar consensuar una definición, el *International Study Group of Rectal Cancer* publica en 2010 una definición y una clasificación de dehiscencia anastomótica (160). La definición que proponen es el defecto de la pared intestinal al lado de la anastomosis que permite una comunicación entre el compartimento intra y extraluminal. El diagnóstico se realiza por signos clínicos que se confirman por endoscopia, pruebas de imagen con contraste o en la reoperación del enfermo. Basado en el tratamiento de la dehiscencia, los autores la clasifican en: grado A, dehiscencia anastomótica que no requiere cambios en el manejo terapéutico; grado B, los que requieren de una intervención que no implica una reoperación; y grado C los que requieren una revisión quirúrgica.

A pesar de no existir acuerdo en la definición (158), los porcentajes de dehiscencia de anastomosis y de infección de órgano-espacio observados en la muestra de 420 pacientes del presente estudio, 8% y 11,2% respectivamente, son similares a los publicados por otros grupos, especialmente si tenemos en cuenta que se han incluido también pacientes con cáncer de recto (120). El porcentaje de dehiscencias de anastomosis en cirugía de colon realizada por cirujanos colorrectales se estima en un 3-8% (161-163) mientras que en cirugía de recto el porcentaje se eleva hasta el 15% (164).

Para poder estudiar el impacto de la infección intraabdominal sobre la recurrencia tumoral y los mecanismos implicados en dicha asociación, fue necesario aparear a nuestros pacientes por factores de confusión, o en otras palabras, por variables que por sí mismas, pudiesen tener un valor pronóstico. Aunque se trata de un estudio prospectivo de cohortes, el proceso de apareamiento tuvo lugar una vez pudimos disponer del informe de anatomía patológica y cuando se confirmó que el posible control no había presentado ninguna complicación postoperatoria. La

elección de 6 variables de apareamiento, 7 en el caso de las neoplasias de recto, dificultó la selección de controles para cada uno de los pacientes con infección peritoneal hasta el punto de que, en la mayoría de los casos, solo encontramos un control para cada paciente del grupo infección. En aquellos casos en los que había más de un control, elegimos el que se aproximaba más de acuerdo con la edad y/o la fecha de intervención. A continuación analizaremos la elección de las variables de apareamiento y los resultados de otras que, sin haber sido utilizadas en el proceso de selección de controles, podían actuar también como factores de confusión.

- Variables clínicas y patológicas empleadas en el apareamiento.

La edad no es factor de riesgo de dehiscencia (165) pero sí se asocia a una mayor mortalidad cuando ésta ocurre. Por otra parte, varios estudios han demostrado que la edad tiene impacto sobre el resultado oncológico, aunque los resultados son controvertidos. Se ha sugerido que en los pacientes jóvenes la enfermedad se presenta en estadios más avanzados y la recurrencia es mayor, aunque no influye en la supervivencia (166). Sin embargo, otros autores han encontrado que la edad es un factor pronóstico independiente, siendo peor el resultado oncológico en pacientes de edad avanzada (167, 168). La edad fue una variable de apareamiento con un rango de \pm 5 años.

Varios estudios sugieren que el sexo masculino es un factor de riesgo de dehiscencia de anastomosis de colon y, sobretodo, de recto (165, 169). Esta asociación es más consistente cuanto más baja es la anastomosis en el recto (170-172), lo que se ha atribuido a la mayor dificultad técnica de la resección de recto en varones con pelvis más estrechas. Sin embargo, el impacto del sexo en la recurrencia y el resultado oncológico es más controvertido (173, 174). En un estudio en el que se incluyeron 33.445 pacientes con cáncer de colon el tiempo hasta la recurrencia fue menor en los varones. Los autores concluyeron que el sexo es un modesto marcador pronóstico independiente. Teniendo en cuenta su posible influencia sobre el resultado oncológico decidimos que el sexo fuese una de las variables de apareamiento (174).

También buscamos controles para cada caso en pacientes intervenidos con una diferencia de tiempo máxima de 3 años. Aunque ha habido pocos cambios en el equipo de cirujanos de la Unidad de Cirugía Colorrectal durante el periodo de selección de pacientes y el tratamiento preoperatorio, intraoperatorio y postoperatorio ha sufrido pocas modificaciones, fundamentalmente debidas a la instauración del protocolo de rehabilitación multimodal (153-155), no quisimos que estas modificaciones influyeran en nuestros resultados.

Como hemos comentado en la introducción, la asociación entre la localización del tumor y recurrencia es controvertida (34, 36, 39). La decisión de aparear los pacientes dependiendo de la localización en colon derecho, izquierdo o recto se hizo, no sólo para evitar un posible factor de confusión en el resultado oncológico, sino también por el impacto de los diferentes procedimientos quirúrgicos realizados sobre la respuesta inflamatoria y angiogénica.

Numerosos estudios multicéntricos aleatorizados han demostrado que no hay diferencias entre la cirugía abierta y la cirugía laparoscópica ni en el porcentaje de dehiscencias de anastomosis ni en el resultado oncológico (23, 24). Sin embargo, considerando la experiencia de nuestro grupo, sí existe una respuesta inflamatoria y angiogénica menor en los pacientes operados por laparoscopia que en los pacientes intervenidos por laparotomía (109, 111, 112). Por este motivo apareamos a nuestros pacientes también según el abordaje quirúrgico.

El estadio tumoral es el factor pronóstico independiente de recurrencia y supervivencia en los pacientes con CCR más importante (12, 45, 46), por lo que era imprescindible aparear a nuestros pacientes por el estadio tumoral según el sistema TNM.

Finalmente, la quimiorradioterapia neoadyuvante está indicada en pacientes con cáncer de recto medio o bajo T3 o más, o en pacientes con sospecha de afectación ganglionar independientemente del estadio T de acuerdo con la estadificación preoperatoria. Varios estudios controlados han demostrado que el tratamiento neoadyuvante se asocia a un mejor resultado oncológico en

comparación con sólo la cirugía en estos pacientes (175). Por ello, la quimiorradioterapia preoperatoria fue una variable de apareamiento en los pacientes con cáncer de recto de nuestra muestra.

- Variables con posibles implicaciones pronósticas no empleadas en el apareamiento.

El sistema ASA es una clasificación que utiliza la *American Society of Anesthesiologists* (ASA) para estimar el riesgo que plantea la anestesia considerando las comorbilidades preoperatorias de los pacientes. La clasificación va desde una puntuación de 1 (paciente sano) hasta un máximo de 5 (enfermo terminal cuya expectativa de vida no se espera que sea mayor de 24 horas, con o sin tratamiento quirúrgico). Una puntuación de 3 a 5 de la clasificación ASA se ha descrito como factor independiente de dehiscencia de anastomosis y mortalidad (171, 176). Por otra parte, las comorbilidades no constituyen un factor independiente asociado a un peor resultado oncológico aunque sí se pueden asociar a una menor supervivencia global. Como podíamos esperar, en nuestra muestra hubo más pacientes ASA 3 y 4 en el grupo infección, pero la diferencia entre grupos no alcanzó la significación estadística.

Las pérdidas hemáticas durante la cirugía y, especialmente, la necesidad de transfusión perioperatoria también se han descrito como factores de riesgo independientes de dehiscencia anastomótica (161, 177, 178) y de recurrencia(179), incluso con la transfusión autóloga (180). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias entre los grupos. Ello es especialmente importante teniendo en cuenta que la transfusión perioperatoria podía haber sido un importante factor de confusión.

Varios estudios han demostrado que el valor preoperatorio de CEA en suero es un factor pronóstico independiente (181). Por este motivo, aunque no era posible introducir más variables de apareamiento, sí que era necesario que los dos grupos fueran comparables para no introducir un factor más de confusión. En este

sentido, no encontramos diferencias en el valor del CEA entre los pacientes del grupo infección y los del grupo control.

Como ya hemos mencionado, los dos grupos fueron apareados en función de que hubiera o no afectación ganglionar. Aunque no se aparearon los pacientes de acuerdo con otras variables anatomo-patológicas como el grado de diferenciación celular, la invasión linfovascular o la invasión perineural, cuya asociación con la recurrencia ha sido demostrada (9, 10, 43, 44), tampoco encontramos diferencias entre los grupos.

Varios estudios han demostrado que un elevado porcentaje de pacientes con CCR en estadio III que presentan una dehiscencia de anastomosis no llegan a recibir tratamiento adyuvante a pesar de estar indicado (182). Sin embargo, aunque en el presente estudio el porcentaje de pacientes que recibió quimioterapia fue menor en el grupo de infección, la diferencia no fue estadísticamente significativa. El diagnóstico y tratamiento precoz de la infección intraabdominal puede contribuir a una rápida recuperación del paciente y permitir la administración de quimioterapia adyuvante, en caso de que ésta sea necesaria.

El tiempo operatorio superior a 2 horas se ha descrito como factor de riesgo de dehiscencia anastomótica (164, 171, 172). Aunque el tiempo operatorio del grupo infección fue mayor, en nuestro estudio esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

Como era de esperar encontramos una asociación entre infección postoperatoria y reoperación. Por un lado y considerando el diseño del estudio, los pacientes del grupo control no presentaron una infección intrabdominal ni otra complicación postoperatoria, por lo que un paciente que hubiese requerido una laparotomía postoperatoria por cualquier complicación (por ejemplo una colecistitis aguda) no formaría parte de este estudio. Por otro lado, la reintervención quirúrgica forma parte del algoritmo terapéutico de una dehiscencia anastomótica (121) e incluso permite la clasificación de dehiscencia en el grupo C (160). La necesidad de reoperación en los pacientes con una dehiscencia de nuestra muestra fue del

53,2%. Debido a la presencia de una complicación postoperatoria, la estancia hospitalaria fue significativamente mayor en el grupo infección; aumentando la estancia hospitalaria media en 3-4 veces más en el grupo infección.

Finalmente, la cirugía de urgencias, ya sea por oclusión o perforación, es un factor independiente de dehiscencia anastomótica (176) y se asocia a un mayor riesgo de recurrencia tumoral y descenso de la supervivencia. Por este motivo, la cirugía de urgencias fue considerada un criterio de exclusión en nuestro estudio. Además, este grupo de pacientes presenta una mayor respuesta inflamatoria (secundaria a la complicación del tumor) antes de la cirugía.

6.2 Respuesta inflamatoria y angiogénica a la infección intraabdominal

6.2.1 Respuesta inflamatoria a la cirugía: influencia de la infección intraabdominal sobre la IL-6

En el presente estudio hemos confirmado que la infección peritoneal postoperatoria induce una respuesta inflamatoria sistémica significativamente mayor que la que tiene lugar en pacientes operados que no presentan ninguna complicación. El valor de IL-6 en suero en el momento del diagnóstico de una infección peritoneal fue cuatro veces mayor que la concentración postoperatoria en los pacientes del grupo control. Dentro del grupo infección, los valores de IL-6 fueron mayores en los pacientes que presentaron una peritonitis respecto los que presentaron un absceso intraabdominal; aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la diferencia entre los pacientes que precisaron de reintervención quirúrgica respecto los que se realizó un tratamiento no quirúrgico (antibioticoterapia más drenaje) sí fue significativa. Estos resultados confirman que la IL-6 es un marcador muy sensible de la respuesta inflamatoria secundaria a la agresión quirúrgica y que está amplificada por la infección intraabdominal.

Debemos atribuir a la infección postoperatoria esta mayor concentración de IL-6 ya que en nuestro estudio no hubo diferencias entre los dos grupos en otros factores relacionados con la respuesta inflamatoria después de la cirugía. Por un lado, no hubo diferencias entre los grupos en cuanto a la localización del tumor (107), y por tanto tampoco en el procedimiento quirúrgico realizado, ni en el tipo de abordaje (109, 111, 112) ni en el estadio tumoral (117, 147, 183), dado que se trata de variables de apareamiento. Por otro lado, tampoco observamos diferencias en la duración de la intervención (184) o la necesidad de transfusión peroperatoria (185).

Otros trabajos anteriores también estudiaron el impacto de la infección intraabdominal sobre la respuesta inflamatoria. Mokart et al evaluaron el impacto de la respuesta inflamatoria secundaria a una infección en pacientes sometidos a cirugía mayor por cáncer (186). En el estudio se incluyeron 30 pacientes operados de esofagectomía, gastrectomía, peritonectomía y exanteriorización pélvica. Los pacientes fueron clasificados en 3 grupos según presentasen una complicación postquirúrgica con shock séptico, pacientes que presentaron sepsis o sepsis grave y pacientes que no presentaron una complicación postoperatoria. Los pacientes con shock séptico o sepsis grave tenían niveles de IL-6 significativamente más elevados que los que no habían sufrido ninguna complicación durante los primeros días del postoperatorio.

Miki et al analizaron el comportamiento de la IL-6 en 196 pacientes intervenidos de CCR y su asociación con la aparición de complicaciones infecciosas postoperatorias. También valoraron otras citoquinas como el VEGF, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) y observaron una inducción moderada a consecuencia de la agresión quirúrgica, que en el grupo de infección fue exacerbada y prolongada durante el postoperatorio (114).

Kimura et al encontraron una elevación significativa de valores de IL-6 en plasma de pacientes que presentaron una infección del sitio quirúrgico después de una duodenopancreatectomía respecto los que no presentaron complicaciones. Además encontraron que estos niveles eran significativamente mayores en pacientes que presentaron una dehiscencia respecto los que tenían otro tipo de infección (187).

Es interesante destacar que varios estudios han demostrado que la determinación precoz de la IL-6 en suero, y también en líquido peritoneal, puede ser un marcador predictivo útil de complicaciones postoperatorias (186, 188). En el estudio de Mokart et al (186), los valores de IL-6 en el primer día del postoperatorio en el grupo de pacientes con sepsis o sepsis grave fueron el doble que los niveles de los pacientes sin complicaciones y en el grupo de shock séptico estos valores se multiplicaron por 6. Los autores concluyeron así que una elevación de IL-6 en el postoperatorio inmediato es predictiva de una complicación séptica. De la misma manera, Szczepanik et al (188) estudiaron los niveles de IL-6 en el postoperatorio inmediato tras cirugía gástrica. Encontraron que valores elevados de IL-6, no sólo se asociaron a complicaciones infecciosas sino también a complicaciones no infecciosas. En el análisis multivariado detectaron que una concentración de IL-6 superior a 278,88 pg/ml el primer día postoperatorio era un factor independiente de complicaciones en general y específicamente infecciosas en cirugía gástrica (188). Strey et al también detectaron niveles elevados de IL-6 en el postoperatorio inmediato de cirugía hepática en pacientes que presentaron complicaciones postoperatorias (184). En un estudio previo realizado por nuestro grupo también observamos que la concentración de IL-6 en suero 48 horas después de la resección de un CCR era más elevada en aquellos pacientes que posteriormente fueron diagnosticados de una infección peritoneal (138). En el presente estudio, con la determinación de IL-6 en el 4º día postoperatorio pretendíamos confirmar que la respuesta inflamatoria era mayor en los pacientes del grupo de infección, por lo que no hemos realizado determinaciones más precoces.

6.2.2 Respuesta angiogénica a la cirugía: influencia de la infección intraabdominal sobre el VEGF

Los resultados de este estudio confirman la observación de un trabajo previo de nuestro grupo en el que demostramos por primera vez que la infección intraabdominal postoperatoria induce una mayor respuesta angiogénica en comparación con la que tiene lugar en pacientes operados que no presentan ninguna complicación (138). A su vez, la asociación entre infección intraabdominal postoperatoria y angiogénesis ya la habíamos demostrado anteriormente en un modelo experimental de cáncer de colon (137). En el presente estudio, el valor de VEGF en suero fue dos veces mayor en el grupo infección respecto al grupo control. A diferencia de la IL-6, esta respuesta angiogénica a la infección no se relacionó con la magnitud de la infección (peritonitis difusa o absceso) ni por el tratamiento que precisó (reoperación o tratamiento conservador).

Se podría discutir que en pacientes con una muy importante respuesta inflamatoria el aumento en la expresión de VEGF podría ser sólo un epifenómeno asociado a la elevación de muchas otras citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, los resultados de algunos estudios previos que ya han sido mencionados sugieren que el aumento en la concentración de VEGF es un marcador auténtico de un incremento en la angiogénesis postoperatoria. En nuestro modelo experimental de cáncer de colon observamos que la infección intraabdominal postoperatoria inducía no sólo un aumento de los niveles séricos de VEGF sino también un aumento de la densidad microvascular, evaluada mediante inmunohistoquímica, en los tumores que recurrían (137). Además, también hemos demostrado que el aumento en la concentración de VEGF tras una colectomía en pacientes con cáncer induce un aumento de la angiogénesis cuando células endoteliales son tratadas *in vitro* con muestras postoperatorias de suero (109).

- **Consideraciones metodológicas en las determinaciones de citoquinas: ELISA**

En la literatura no hemos encontrado limitaciones en la técnica ELISA para la determinación de IL-6. Además, los resultados obtenidos son consistentes en este trabajo y con los resultados de estudios previos (109, 138).

En cambio, se han descrito diferentes técnicas para determinar el VEGF circulante, lo que podría explicar la variabilidad de resultados entre los diferentes estudios, dependiendo de la prueba utilizada. Algunos investigadores utilizan técnicas de inmunoensayo competitivas que detectan la cantidad total de VEGF circulante. Otros utilizan técnicas de inmunoensayo de captura con anticuerpos neutralizantes que detectan sólo el VEGF libre. Finalmente, algunos ensayos utilizan anticuerpos específicos para algunas isoformas de VEGF(189). El método empleado en el presente estudio es una técnica de inmunoensayo cuantitativa de captura ampliamente utilizada y que ha sido diseñada para medir los niveles de VEGF₁₆₅ libre que es la forma predominante. De acuerdo con el fabricante, los resultados obtenidos en la determinación del VEGF humano producido de forma natural y en la determinación del VEGF₁₂₁ recombinante son superponibles con las curvas de estándar que se consiguen con ese *kit*, por lo que se considera que puede ser utilizado para determinar los valores relativos de VEGF humano.

Finalmente, otro aspecto metodológico de nuestro estudio que debe ser comentado, relacionado con el análisis de los niveles de VEGF, es la elección de muestras de suero para realizar dichas determinaciones, en vez de plasma. Algunos consideran que la determinación de VEGF es más apropiada en plasma (189, 190) que en suero. La centrifugación de la sangre coagulada da lugar al suero, mientras que la centrifugación de una muestra de sangre a la que se ha añadido un anticoagulante proporciona plasma. El VEGF almacenado en los leucocitos y en las plaquetas es liberado durante el proceso de formación de los coágulos, lo que explica porqué los niveles de VEGF en suero son

considerablemente más elevados que los del plasma (190). En cambio, esta liberación de VEGF de leucocitos y plaquetas está minimizada en la obtención de plasma debido a que se ha añadido un anticoagulante; por lo que se cree se obtiene una concentración de VEGF circulante libre más fiable. Sin embargo, se ha demostrado que las plaquetas aisladas de pacientes con cáncer contienen más VEGF que las plaquetas aisladas de controles sanos (191, 192). También se ha demostrado que la concentración de VEGF en suero de pacientes con cáncer es mayor que en controles sanos, ambos con un recuento plaquetario normal (193). Estos hallazgos sugieren que la agregación plaquetaria puede contribuir a la progresión tumoral liberando diferentes factores solubles como el VEGF; por lo que algunos sugieren utilizar el suero en vez del plasma para tener en cuenta el efecto del VEGF liberado por las plaquetas. Además, en un estudio reciente se ha demostrado mediante análisis multivariado que una concentración preoperatoria elevada de VEGF en suero es un factor predictivo independiente de una menor supervivencia, mientras que una concentración elevada en plasma no lo es (194). Por todas estas razones creemos que está justificada la elección de suero como muestra para la determinación del VEGF en el presente estudio.

6.2.3 Caracterización extensa de citoquinas implicadas en las respuestas inflamatoria y angiogénica en pacientes con una infección peritoneal postoperatoria: arrays de anticuerpos

Debido a que la respuesta inflamatoria es un proceso complejo que implica la liberación de gran cantidad de factores proteicos solubles, tanto de forma local como sistémica, ampliar la caracterización de esta respuesta inflamatoria nos permite valorar su posible utilidad como biomarcadores, por ejemplo tal como hemos realizado con IL-6 y VEGF. En segundo lugar, analizar un cierto número de citoquinas con distintas propiedades funcionales, aunque difícil, podría adicionalmente aportar pistas valiosas sobre los mecanismos que actúan sobre las células tumorales residuales y su progresión a tumores recurrentes, particularmente si consideramos el mecanismo de recurrencia como multifactorial.

Las citoquinas poseen un comportamiento funcional muy complejo que consiste en: pleiotropía (múltiples efectos al actuar sobre diferentes células), redundancia (varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto), sinergismo (dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente) y antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos). Todas estas características dificultan la obtención de conclusiones claras a partir de un estudio basado meramente en su abundancia dentro de la reacción inflamatoria.

Los niveles de las 43 citoquinas inflamatorias y angiogénicas analizadas, están significativamente aumentados en presencia de infección intraabdominal postoperatoria respecto a los pacientes que no presentaron complicaciones después de cirugía curativa de CCR. Por tanto, confirmamos que la respuesta inflamatoria y angiogénica secundaria a la cirugía se amplifica en presencia de una infección intraabdominal postoperatoria. Cabe destacar que de las 43 citoquinas estudiadas se incluyen citoquinas pro y antiinflamatorias y pro y antiangiogénicas. Es decir, tengan un efecto positivo o negativo sobre la respuesta inflamatoria y angiogénica, todas ellas están elevadas.

Estos resultados significan una validación del análisis mediante arrays de anticuerpos ya que dan lugar a los resultados esperados, esto es, una inducción notable de las citoquinas durante el postoperatorio del grupo infección. Además, estas citoquinas en conjunto muestran también una esperada variabilidad entre parejas, así como una variabilidad en la magnitud de la inducción; que se podría justificar por la diversa gravedad de las complicaciones postoperatorias (figura 21).

- **Consideraciones metodológicas en las determinaciones de citoquinas: arrays de anticuerpos**

La técnica ELISA y la técnica de arrays de anticuerpos tienen un mismo objetivo que es la detección de proteínas, en este caso del tipo citoquinas, de una muestra determinada. La diferencia entre ambas técnicas es que mientras que con la técnica ELISA detectamos una sola citoquina en diferentes muestras, el arrays de

anticuerpos nos permite la detección de múltiples citoquinas en una sola muestra (figuras 7 y 10). Estos arrays de anticuerpos nos han permitido estudiar muestras de suero de un número considerable de factores solubles, además de IL-6 y VEGF. A diferencia del ELISA, una de las limitaciones del array de anticuerpos es que no incluyen la obtención de una recta patrón con la que estimar la concentración real de cada citoquina. En este sentido, sólo nos aportan una medida de su abundancia relativa entre muestras. No obstante, el hecho de que en nuestro análisis hayamos obtenido inducciones de entre 2 y cientos de veces en casi todas las citoquinas, en una u otra muestra, hace pensar que las cuantificaciones obtenidas son al menos proporcionales, si no muy aproximadas, a las concentraciones reales en los sueros (figura 21).

6.3 Efecto de la infección intraabdominal postoperatoria sobre la actividad de las células tumorales

6.3.1 Resultados de proliferación, migración e invasión en suero

- Sueros y ensayos in vitro en la línea celular MDA-MB231**

El suero de pacientes que han sufrido una infección postoperatoria estimula la proliferación y migración de células MDA-MB-231 en comparación con los sueros de pacientes que no han sufrido ninguna complicación.

Es conveniente matizar que la inducción de la proliferación celular por efecto del tratamiento con sueros de pacientes infectados, a pesar de ser estadísticamente significativa, es más bien modesta en términos absolutos. Esta inducción representa un aumento de poco más del 2,5% al comparar muestras postoperatorias con preoperatorias. La significación proviene, seguramente, de la alta potencia estadística de nuestro tamaño muestral y de la homogeneidad de las mediciones obtenidas. En este sentido, la relevancia in vivo de este efecto estaría todavía por determinar, y consideramos que, de momento, este resultado debería

ser valorado en otros modelos o condiciones experimentales. En relación a ello, uno de los efectos más destacables de la infección postoperatoria sobre la recurrencia en el modelo de ratones transplantados ortotópicamente fue la obtención de una mayor masa tumoral (137), lo cual apoyaría la existencia de un estímulo positivo sobre la proliferación celular por la presencia de infección. Por otro lado también es plausible considerar que un estímulo proliferativo de baja magnitud, pero persistente durante varios días, podría facilitar la supervivencia de células y/o microtumores residuales en fases críticas de su crecimiento hacia tumores recurrentes.

- **Sueros y ensayos in vitro en la línea celular SW620**

Al analizar la capacidad de proliferación e invasión de la línea celular SW620 encontramos que los sueros de pacientes que han sufrido una infección postoperatoria muestran también una tendencia a la estimulación, tal como ocurría con la línea MDA-MB-231, aunque en este caso el efecto no es estadísticamente significativo.

6.3.2 Resultados de proliferación, migración e invasión en líquido peritoneal

- **Limitaciones metodológicas con muestras de líquido peritoneal**

La toma de muestras de líquido peritoneal basal o preoperatoria en nuestro ensayo presenta alguna limitación metodológica. La obtención de líquido peritoneal antes de la intervención hubiera precisado la realización de una punción-lavado peritoneal no justificada desde un punto de vista ético. Por ello decidimos obtener las muestras inmediatamente después de realizar la laparotomía o el neumoperitoneo dependiendo de la vía de abordaje.

La obtención de muestras de líquido peritoneal postoperatorio también debe ser comentada desde un punto de vista metodológico. En todos los casos, el líquido

fue obtenido a través de un drenaje aspirativo cerrado dejado en el lecho quirúrgico. La muestra obtenida correspondía al líquido acumulado en el drenaje durante las últimas horas. No se trata, por lo tanto, del líquido recién obtenido de la cavidad abdominal y ello podría ser considerado un defecto metodológico. Sin embargo, Hormbrey et al (195) demostraron que no había diferencias en la concentración de VEGF entre el líquido del drenaje recién obtenido y el acumulado durante 24 horas al estudiar la respuesta angiogénica local en pacientes intervenidas de cáncer de mama. Estos resultados extrapolados a nuestro estudio sugieren que la respuesta inflamatoria es, al menos parecida, en un periodo de 24 horas; por lo que no creemos que se trate de un sesgo.

Otros grupos que han utilizado muestras de líquido peritoneal refieren otras limitaciones en su recogida (115, 196). Por un lado, no se puede corroborar que el drenaje se mantenga justo al lado de la anastomosis ya que está sujeto sólo a la piel y podría desplazarse en la cavidad intraabdominal. Por otro lado, el líquido peritoneal es libre en la cavidad, por lo que podría no recogerse completamente a través del drenaje.

Finalmente, hemos seguido un protocolo de forma sistemática en la recogida, procesamiento y almacenaje de las muestras de líquido peritoneal (ver apartado 4.7.2) para evitar variabilidades entre los investigadores (196) que pudiesen interferir en el análisis de las muestras.

- **Efecto citotóxico de muestras de líquido peritoneal**

En el análisis del efecto del líquido peritoneal, respecto a los sueros, encontramos que en la mitad de las muestras aproximadamente existe un efecto citotóxico que da lugar a la muerte de las células. Definimos el efecto citotóxico cuando el valor de proliferación celular observado tras aplicar el líquido peritoneal durante 24 horas disminuye como mínimo hasta un 25% del valor de células no tratadas.

La citotoxicidad observada en parte de las muestras de líquido peritoneal se reveló durante las primeras 24 horas de incubación en ambas líneas celulares (en algunas muestras seleccionadas, el efecto también se reprodujo en otras líneas celulares), por lo que interpretamos que se trataba de un efecto real de las muestras y no una reacción producida por una línea tumoral en concreto. Este efecto citotóxico se objetivó sólo en muestras postoperatorias, lo que sugiere que no se trate de un problema de procesamiento y conservación de muestras. Finalmente, el efecto citotóxico se observó en ambos grupos, obteniendo parejas de muestras con efecto citotóxico sólo en el grupo infección, o en el grupo control o, en pocas ocasiones, vimos este efecto en ambas muestras de la pareja. No encontramos una asociación entre el efecto citotóxico y la presencia o no de infección; por lo que la presencia de muerte celular no está asociada a un grupo. Tampoco asociamos este efecto citotóxico a una característica clínico-patológica de los pacientes.

Intentando dar una explicación al mecanismo de muerte celular inducido por algunos líquidos peritoneales, determinamos que podría corresponder, sólo en parte, a una acidosis intraperitoneal. Esto se debe a que el efecto citotóxico *in vitro* resultaba parcialmente reversible al sobre-tamponar el medio de cultivo utilizado en los tratamientos con tampón HEPES, por lo que seguramente existan otros factores implicados. A fecha de entrega de esta tesis doctoral seguimos intentando dar una explicación del efecto de estas muestras. Para preservar la homogeneidad de las parejas en nuestro ensayo *in vitro* eliminamos las dos muestras de cada pareja, dónde una de ellas, al menos presentaba un efecto citotóxico (la muestra infección, la control o ambas). Por este motivo, creemos que la eliminación de estas parejas evita un posible sesgo en nuestro estudio. Además, la significación estadística de los resultados utilizando muestras de líquido peritoneal es fuerte, y estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos de las muestras de suero en el mismo ensayo.

- **Líquidos peritoneales y proliferación celular en las líneas MDA-MB-231 y SW620**

La proliferación de células MDA-MB-231 al aplicarles líquido peritoneal de pacientes infectados resultó significativamente disminuida en ambos grupos al comparar muestras postoperatorias y preoperatorias. Se observaron resultados parecidos en la línea celular SW620. Curiosamente si comparamos las muestras preoperatorias de ambos grupos observamos un aumento de la proliferación en el grupo infección respecto al control, pero esta diferencia no se mantiene al comparar las muestras postoperatorias de ambos grupos. Aunque hay diferencias entre grupos en la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 y SW620 al comparar valores postoperatorios y preoperatorios, el análisis de sus diferencias no alcanza la significación.

- **Líquidos peritoneales y migración e invasión celular en las líneas MDA-MB231 y SW620**

Destaca el comportamiento de las células MDA-MB-231 y SW620 en los ensayos de migración e invasión respectivamente. Observamos un aumento de la capacidad de migración e invasión en las muestras postoperatorias respecto las basales del grupo infección. Al comparar las diferencias entre muestras postoperatorias y preoperatorias entre el grupo control y el grupo infección, se observa una inducción significativa de la capacidad migrativa e invasiva en el grupo infección.

En definitiva, basados en los ensayos in vitro realizados con muestras de líquido peritoneal, podríamos decir que las muestras del grupo de infección estimulan la migración e invasión sin afectar a la proliferación que incluso es menor en ambos grupos respecto a las muestras basales.

6.3.3 Correlación entre la actividad celular *in vitro* y el patrón de citoquinas inducida por la infección

Una vez caracterizadas las actividades celulares (proliferación, migración e invasión) en cada uno de los grupos, quisimos estudiar si existía alguna correlación con los resultados de expresión de citoquinas hallados en los ensayos ELISA y de arrays de anticuerpos. Específicamente, el objetivo fue estudiar si la mayor respuesta inflamatoria y angiogénica tenían una correlación a la mayor capacidad de proliferación, migración e invasión celular en el grupo infección. Para ello, calculamos el coeficiente de correlación de Spearman para cada una de las variables.

No encontramos ninguna correlación significativa entre los resultados de los ensayos ELISA de IL-6 y VEGF con cada uno de los resultados de proliferación, migración e invasión celular en suero y líquido peritoneal en el grupo infección.

Tampoco encontramos una correlación entre la inducción de citoquinas inflamatorias y angiogénicas estudiadas con los arrays de anticuerpos y las diferentes actividades celulares en el grupo infección.

Creemos que existen principalmente dos motivos que podrían explicar este resultado negativo de asociación entre respuesta inflamatoria y angiogénica y actividad celular en los pacientes infectados. Por un lado, cabría suponer que la gran variabilidad en la magnitud de la inducción de citoquinas entre pacientes del mismo grupo, sobre todo en los infectados, sería consecuencia de la magnitud de la respuesta a la infección. De tal manera, que respuestas exacerbadas podrían enmascarar posibles rangos de expresión mínimos más relacionados con sus efectos sobre la actividad de las células tumorales. Por otro lado, como ya hemos mencionado a lo largo de este trabajo, la respuesta inflamatoria y angiogénica ampliada en los pacientes que presentan una infección es compleja por la diversidad de vías que participan así como el desconocimiento de, al menos, parte de ellas. Quizás el aumento de una sola citoquina debida a la infección no es responsable directa de la mayor actividad celular descrita en nuestro trabajo; y

es la expresión de varias de ellas la que podría inducir un cambio directo en la actividad celular, por ejemplo. Creemos, en definitiva, que este resultado negativo podría estar indicando que el aumento de actividad celular encontrado en las células tumorales depende de múltiples factores, incluyendo la posible acción sinérgica de varias citoquinas, la receptividad de las células en cada tumor, la posible participación de células del estroma, u otros mecanismos todavía por descubrir (ver apartado 6.5.1).

6.4 Asociación entre las variables clínicas, patológicas y el resultado oncológico: el valor de la infección peritoneal postoperatoria

En el presente estudio hemos observado que la recurrencia tumoral fue mayor en aquellos pacientes que presentaron una infección peritoneal durante el curso postoperatorio (grupo control: 12,5% vs. grupo infección: 25,5%; P=0,001). Además, el análisis mediante la regresión de Cox mostró que la infección peritoneal se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad. La supervivencia global también fue significativamente menor en el grupo de pacientes que presentaron una infección intraabdominal tras la intervención quirúrgica. Se ha sugerido que la supervivencia libre de enfermedad es una variable alternativa que puede sustituir a la supervivencia global en los ensayos clínicos en oncología (197).

La asociación entre dehiscencia de anastomosis, infección peritoneal y un peor resultado oncológico refuerza el valor pronóstico del cirujano en los pacientes intervenidos de CCR y obliga, todavía más si cabe, a que la morbilidad postoperatoria se mantenga dentro de los estándares de calidad exigidos (18, 198). En este sentido, los porcentajes de dehiscencia de anastomosis y de infección órgano-espacio observados en el presente estudio, 8% y 11,2%

respectivamente, se encuentran dentro de dichos estándares, especialmente si tenemos en cuenta que se han incluido también pacientes con cáncer de recto.

Se ha descrito en la literatura que la concentración plasmática de CEA preoperatorio tiene implicaciones pronósticas (170), incluso en algún estudio es factor pronóstico independiente del estadio tumoral (199). Sin embargo, nosotros no encontramos una asociación entre una elevación del CEA preoperatorio y la aparición de una recurrencia tumoral como han descrito otros autores (200).

Hemos detallado en la introducción el valor pronóstico que tienen el número de ganglios metastáticos resecados en la pieza quirúrgica que define el estadio tumoral. La afectación de ganglios por células tumorales (que corresponde a un estadio III tumoral) respecto la no afectación de ganglios (estadio I y II) no se asoció a la recurrencia tumoral en nuestra muestra. Obtenemos una recurrencia tumoral similar en los pacientes infectados en ambos estadios. Creemos que el efecto de la infección es tan influyente que podría ser responsable de la igualdad en el pronóstico entre estadios en nuestro estudio.

Paradójicamente, el número de ganglios resecados si se halló asociado a recurrencia. La asociación observada entre el número de ganglios identificados por el patólogo y el resultado oncológico es conocida y refleja la importancia de una correcta estadificación tras la cirugía (48, 49, 88, 89). Un número mayor de ganglios identificados es factor protector de recurrencia en nuestro análisis univariado.

Otras variables anatomicopatológicas del tumor, como la infiltración perineural o vascular, que son factores independientes de mal pronóstico (9, 10, 52) no se asociaron a la recurrencia en nuestra muestra de pacientes.

La administración de quimioterapia adyuvante cuyo valor pronóstico ha sido demostrado en un gran número de estudios (201, 202) no se asociaron de forma significativa con un mayor riesgo de recurrencia probablemente por el limitado

número de pacientes que recibieron quimioterapia, dado que casi el 60% de los pacientes tuvieron un estadio I y II.

A pesar de que este estudio no fue diseñado con el objetivo de encontrar diferencias en el resultado oncológico, nuestros resultados coinciden con los de varios estudios de cohortes y casos-controles publicados en los últimos años que sugieren que la dehiscencia de anastomosis y la consiguiente infección peritoneal se asocian con porcentajes más elevados de recurrencia y con una mayor mortalidad relacionada con el cáncer (119, 123, 125-128, 182, 203, 204). En el análisis univariado la infección peritoneal postoperatoria es factor de riesgo de recurrencia, con una razón de riesgo de casi 3 veces en los pacientes que recurren respecto los que no recurren. McArdle et al (127) analizaron el impacto de la dehiscencia de anastomosis sobre la supervivencia a largo plazo en una cohorte de 2.235 pacientes intervenidos de cáncer de colon y recto. La supervivencia a los 5 años relacionada con el cáncer fue del 42% en pacientes que presentaron una dehiscencia de anastomosis y del 67% en aquellos que no presentaron una dehiscencia, diferencia estadísticamente significativa. Así, la razón de riesgo para los pacientes con una dehiscencia en comparación con los que no la tuvieron fue de 1,61 para la supervivencia global y 1,99 para la supervivencia relacionada con el cáncer. Law et al (119) analizaron una serie de 1.580 pacientes que incluía cáncer de colon y recto, de los cuales 60 (3,8%) presentaron una dehiscencia. La supervivencia a los 5 años relacionada con el cáncer en pacientes con y sin dehiscencia de anastomosis fue del 56,9% y 75,9%, respectivamente, diferencia estadísticamente significativa. La dehiscencia fue un factor independiente asociado a una menor supervivencia en el análisis multivariado. En un estudio más reciente realizado por el *Veterans Affairs Surgical Quality Improvement Program* en el que se incluyeron datos de 12.075 pacientes intervenidos de CCR con intención curativa se observó que las complicaciones postoperatorias infecciosas eran un factor independiente asociado a una menor supervivencia a largo plazo (205). En nuestro estudio la infección peritoneal se asoció a un mayor riesgo de recurrencia en el análisis univariado. Ya hemos

mencionado anteriormente los motivos por los que no hemos realizado un análisis multivariado.

Es interesante señalar que el peor resultado oncológico observado en los pacientes con infección peritoneal en el presente estudio se debió a un mayor porcentaje de metástasis a distancia, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística en este subanálisis por tipos de recurrencia. No hemos encontrado diferencias en la recurrencia local a diferencia de muchos otros estudios (119, 125, 206-208). En el estudio de Law et al la recurrencia a los 5 años en pacientes con y sin dehiscencia fue del 53,8% y 27,2% respectivamente (119). Los autores encontraron que tanto la recurrencia local como la sistémica fueron significativamente mayores en aquellos pacientes que presentaron una dehiscencia. La dehiscencia fue un factor independiente asociado con la recurrencia sistémica para todos los pacientes, mientras que fue un factor independiente asociado a la recurrencia local sólo en el subgrupo de pacientes con cáncer de recto. Chang et al (206) realizaron un estudio retrospectivo sobre 406 pacientes con cáncer de recto, 25 de los cuales presentaron una dehiscencia de anastomosis. Después de un seguimiento medio de 60,5 meses se diagnosticó una recurrencia en 124 pacientes. La incidencia de recurrencia local (20% vs. 8,4%) y también la sistémica (44% vs. 26%) fueron significativamente más elevadas en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia. Eberhardt et al (207) diseñaron un estudio prospectivo de casos con controles apareados muy similar al nuestro. En este caso, cada paciente con una infección peritoneal, ya fuera un absceso o una dehiscencia de anastomosis, fue apareado con dos pacientes sin infección. Se realizó un análisis por separado del cáncer de colon y recto. En el caso del cáncer de colon se compararon 59 pacientes con infección peritoneal frente 118 sin infección y no encontraron diferencias en la recurrencia a los 5 años ni tampoco en la mortalidad global ni relacionada con el cáncer. En el caso del cáncer de recto se compararon 97 pacientes con infección peritoneal con 194 controles. A los 5 años, la recurrencia local, la recurrencia global y la mortalidad relacionada con el cáncer fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes que habían presentado un absceso o dehiscencia. Fujita et al (208) analizaron la incidencia de recurrencia y el pronóstico de pacientes con

dehiscencia de anastomosis en una serie de 1.172 pacientes tras cirugía de cáncer de colon y recto. Treinta y tres pacientes presentaron una dehiscencia clínica y/o radiológica y fueron comparados con los otros 947 pacientes sin que hubiera diferencias en las características de los pacientes ni en el estadio tumoral. El porcentaje de recurrencia fue significativamente mayor en aquellos que habían presentado una dehiscencia, a expensas fundamentalmente de un mayor porcentaje de recurrencia local en los pacientes con cáncer de recto.

Sin embargo, otros autores han observado esta asociación únicamente con la recurrencia a nivel sistémico (126, 182), lo que apoya nuestros resultados. Katoh et al (126) encontraron que la dehiscencia se correlacionó con la aparición de metástasis a distancia, pero no con la recurrencia local, en una serie de 207 pacientes con CCR. Krarup et al (182) demostraron recientemente que la dehiscencia de una anastomosis se asociaba de forma significativa con un mayor porcentaje de recurrencia sistémica en el estudio nacional de cohortes sobre 9.333 pacientes con cáncer de colon, pero no observaron un impacto en la aparición de una recurrencia local. En un estudio reciente de nuestro grupo en el que analizamos 200 pacientes con cáncer de colon en estadio II intervenidos con intención curativa, la infección peritoneal postoperatoria se asoció de forma significativa con una menor supervivencia libre de enfermedad (209), relacionada con un mayor porcentaje de metástasis a distancia. Creemos, tal y como han sugerido otros autores, que ello es debido a que la mayoría de los pacientes incluidos presentaban un cáncer de colon en los que, a diferencia del cáncer de recto, la recurrencia local se diagnostica con muy poca frecuencia por lo que sería necesario un número muy elevado de pacientes para obtener diferencias (182).

Que en algunos estudios la dehiscencia se asocie sólo a una mayor recurrencia local podría ser explicado por una peor calidad de la cirugía cuyas variables no son tenidas en cuenta en el análisis. De esta forma, una técnica quirúrgica inadecuada no sólo tendría consecuencias negativas a corto sino también a largo plazo: la dehiscencia de anastomosis y la recurrencia local, respectivamente. En este sentido, algunos de los estudios mencionados anteriormente han sido

criticados porque no se incluyó en el análisis multivariado variables tan importantes como la realización de una exéresis total del mesorrecto o la administración de neoadyuvancia (204, 208). Sin embargo, Ptak et al (128) analizaron datos recogidos de forma prospectiva sobre 1.741 pacientes intervenidos de cáncer de recto. Se incluyeron únicamente pacientes con márgenes negativos y se tuvo en cuenta no sólo variables relacionadas con el paciente o con el tumor sino también otras relacionadas específicamente con el tratamiento recibido como la quimioradioterapia preoperatoria, la exéresis total del mesorrecto, la ileostomía derivativa o la duración de la cirugía. El análisis de regresión logística de Cox mostró que el estadio tumoral y la dehiscencia de anastomosis, que precisó de una reintervención quirúrgica, tenían un efecto independiente sobre la recurrencia local a los 5 años. Es interesante señalar como en este estudio, la dehiscencia de anastomosis que se solucionó con tratamiento conservador no tuvo un efecto independiente sobre la recurrencia. Otros autores han destacado también la asociación entre la reintervención en el postoperatorio inmediato y el resultado oncológico. Khouri et al (210) analizaron el resultado de 89 pacientes intervenidos de cáncer de colon y recto que fueron reoperados en el postoperatorio inmediato y los compararon con otros 89 pacientes que no precisaron una reintervención. La causa de la reintervención fue la dehiscencia o el absceso intraabdominal en la mitad de los pacientes seguida del hemoperitoneo, la obstrucción intestinal y en complicaciones de la herida. La supervivencia global y libre de enfermedad a los 5 años fueron significativamente menores entre los pacientes reoperados. Hay que señalar, sin embargo, la existencia de factores de confusión como la necesidad de transfusión, mayor entre los pacientes reoperados y la administración de quimioterapia adyuvante que fue menor en este grupo. A pesar de estos factores de confusión, los autores consideran que la respuesta inflamatoria sistémica asociada a la reintervención puede tener un impacto en el resultado oncológico a largo plazo. En este sentido, cuando se incluyó la transfusión y la quimioterapia entre las variables de apareamiento y se realizó un análisis por subgrupos, se observó una menor supervivencia a los 5 años entre los pacientes reoperados por dehiscencia (52% vs. 70.8%; P=0,19) y por hemorragia (48,9% vs. 59,3%; P=0,47) en comparación con los no reoperados aunque las diferencias no alcanzaron la significación

estadística. En el presente estudio, debido al número escaso de pacientes al realizar el subanálisis (sobre 12 pacientes que recurren del grupo infección) entre pacientes con infección que fueron reoperados (3 pacientes) y los que fueron tratados de forma conservadora (9 pacientes), no realizamos este análisis. Si aumentásemos el número de pacientes de la muestra o el tiempo de seguimiento, obtendríamos rangos más estrechos y aumentaríamos la potencia estadística.

A pesar del número cada vez mayor de trabajos que apoyan esta asociación, otros estudios no la han confirmado por lo que el impacto de la infección peritoneal sobre el resultado oncológico es todavía para algunos autores objeto de controversia (129, 130, 211, 212). En un estudio retrospectivo sobre 393 pacientes con cáncer de colon izquierdo y recto intervenidos de forma consecutiva con intención curativa, los autores no encontraron diferencias en la supervivencia global ni en la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años entre aquellos que presentaron una sepsis intrabdominal y los que no (212). Hay que señalar que 5 pacientes que presentaron dehiscencia de anastomosis fueron excluidos por no cumplir unos criterios muy estrictos de sepsis intraabdominal. Otra de las limitaciones de este estudio es la elevada mortalidad postoperatoria en el grupo de dehiscencia que disminuyó el número de pacientes en los que se realizó seguimiento: 15 (25%) de los 59 pacientes que presentaron una dehiscencia fallecieron en el postoperatorio inmediato en comparación con los 17 (5%) de los 334 pacientes sin dehiscencia. Eriksen et al (130) tampoco encontraron ningún efecto de la dehiscencias anastomótica sobre la recurrencia en un estudio prospectivo sobre 1.958 pacientes con cáncer de recto incluidos en el registro nacional de cáncer de recto de Noruega. El porcentaje de dehiscencia fue del 11,6%. La recurrencia local a los 5 años fue del 11,6% en el grupo de pacientes con dehiscencia y 10,5% en el grupo sin dehiscencia, diferencia no significativa. La supervivencia a los 5 años fue mayor en los que no presentaron dehiscencia (59% vs. 67,4%; P=0,021). Sin embargo, cuando se excluyó del análisis de supervivencia a los pacientes que fallecieron en los 30 primeros días tras la operación no se encontró diferencias entre los grupos (P=0,226). Jörgren et al (211) seleccionaron pacientes del *Swedish Rectal Cancer Trial* a los que se les

había practicado una resección anterior de recto y que habían presentado una dehiscencia de anastomosis. Estos pacientes (n=114) fueron comparados con un grupo control (n=136) seleccionado de forma aleatoria entre los pacientes que no presentaron una dehiscencia. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de recurrencia local ni sistémica entre los dos grupos. Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia acumulada a los 5 años. Sin embargo, es interesante destacar que tanto la recurrencia local como la sistémica mostraron una tendencia a ocurrir antes en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia. Una importante limitación de este estudio es la forma de selección de los controles puesto que aunque no presentaron dehiscencia pudieron haber presentado otras complicaciones que influyeran en el resultado. En otro estudio, Richards et al (213) investigaron el impacto de las complicaciones postoperatorias en la recurrencia después de la resección de CCR. Los autores no encontraron ninguna asociación entre las complicaciones quirúrgicas y el riesgo de recurrencia. Sin embargo, no se hizo un subanálisis de los diferentes tipos de complicaciones debido al limitado número de pacientes incluido y los autores reconocen que es posible que sólo las principales complicaciones infecciosas, como la dehiscencia anastomótica, tenga una influencia negativa sobre el resultado oncológico.

Con el fin de contribuir a aclarar la controversia, se ha publicado un meta-análisis que incluye 21.092 a partir de 21 estudios, la mayoría de los cuales hemos mencionado anteriormente, 7 retrospectivos y 14 prospectivos (120). Todos estos estudios describían la influencia de la dehiscencia anastomótica sobre la recurrencia local o a distancia y sobre la supervivencia específica relacionada con el cáncer tras cirugía con intención curativa del CCR. El meta-análisis de los datos de 13 estudios que presentaban resultados sobre dehiscencia y recurrencia local tras cirugía de cáncer de recto demostró un efecto significativo que favorecía una mayor recurrencia local tras la dehiscencia con una razón de oportunidades (OR, *odds ratio*) de 1,6 (IC95%: 1,33-1,92; P=0,0001). Tres estudios presentaban datos sobre dehiscencia y recurrencia local exclusivamente tras anastomosis colónicas y aunque la recurrencia era mayor en pacientes con dehiscencia la diferencia no fue significativa, OR 2,16 (IC95%: 0,88-5,29; P=0,094). Nueve estudios

presentaron datos sobre dehiscencia y recurrencia local incluyendo cirugía de colon y recto. El OR de recurrencia local en pacientes en los que se había producido una dehiscencia fue 2,9 (IC95%: 1,78-4,71; P=0,0001). Siete de los 21 estudios proporcionaron datos sobre el impacto de la dehiscencia de anastomosis sobre las metástasis a distancia. Aunque el número de recurrencias a distancia fue mayor en los pacientes que habían presentado una dehiscencia, la diferencia no alcanzó la significación estadística, OR 1,38 (IC95%: 0,96-1,99; P=0,083). Finalmente 14 estudios proporcionaron datos sobre la supervivencia a largo plazo tras dehiscencia de anastomosis. El meta-análisis de todos estos estudios que incluyó un total de 17.256 pacientes demostró una disminución significativa de la supervivencia relacionada con el cáncer después de una dehiscencia con una OR 1,64 (IC95%: 1,4-1,91; P=0,0001). Tras excluir aquellos estudios en los que no se había ajustado por la mortalidad en el postoperatorio inmediato quedaron 11 estudios cuyo nuevo análisis confirmó la asociación entre dehiscencia y mortalidad a largo plazo relacionada con el cáncer con un OR 1,75 (IC95%: 1,47-2,1; P=0,0001). Con todos estos resultados, los autores concluyen que hay evidencias suficientes para considerar que la dehiscencia de anastomosis tiene un claro efecto adverso sobre los resultados oncológicos con una mayor incidencia de recurrencia local y una menor supervivencia a largo plazo tras cirugía de CCR. Los autores consideran que es difícil aportar mejores evidencias dado que se necesita un número muy elevado de pacientes para una complicación cuya incidencia es baja.

En este sentido, es interesante destacar que en el presente estudio hemos observado diferencias en el resultado oncológico con sólo 47 pacientes por grupo, cuando en la mayoría de los estudios que han investigado esta asociación el tamaño de la muestra es muy superior. Una posible explicación es que, a diferencia de dichos estudios, el grupo control está seleccionado entre aquellos pacientes que no presentaron ningún tipo de complicación durante el postoperatorio, lo que acentúa las diferencias entre ambos grupos. Hay que señalar que la influencia negativa sobre el resultado oncológico a largo plazo no se limita a las infecciones peritoneales sino que incluye también otras

complicaciones infecciosas y no infecciosas. Takeuchi et al (214) observaron que la bacteriemia/sepsis tenía un efecto negativo independiente sobre la supervivencia a largo plazo en una serie de 65 pacientes consecutivos a los que se les había practicado una esofaguestomía.

La asociación entre infección peritoneal y recurrencia tumoral se ha observado también tras la resección de metástasis hepáticas (215-217) y otras neoplasias digestivas. En un estudio reciente en el que se incluyeron 705 pacientes a los que se les había practicado una resección hepática por metástasis de origen colorrectal, la presencia de complicaciones postoperatorias infecciosas fue un factor predictivo independiente de supervivencia libre de enfermedad junto con un número de metástasis superior a 8 y la transfusión sanguínea (215). Hsu et al observaron también en un estudio retrospectivo de 252 pacientes que el desarrollo de un absceso hepático tras metastasectomía era un factor pronóstico independiente (218). Nagasako et al observaron en una serie de 400 pacientes a los que se les había practicado una gastrectomía por un cáncer gástrico precoz que aquellos que habían presentado una complicación en la anastomosis tenían una supervivencia a los 5 años significativamente peor que los que no habían tenido dicha complicación (219).

A diferencia de la mayoría de los trabajos publicados, en el presente estudio hemos realizado un análisis por estadios tumorales en el que se observa que las diferencias en recurrencia entre pacientes con y sin infección intraabdominal aparecen tanto en el estadio II como en el estadio III. Nuevamente, la obtención de conclusiones a partir de este resultado debe realizarse con cautela dado que el estudio no fue diseñado con este objetivo y que el número de pacientes al realizar el análisis por subgrupos es muy bajo. Sin embargo, la confirmación de esta observación en series más largas podría ampliar las indicaciones de tratamiento adyuvante si consideramos que los pacientes en estadio II con una infección peritoneal postoperatoria tienen un peor pronóstico. En el estudio de Katoh et al (126) analizaron específicamente el riesgo de recurrencia sistémica relacionada con la dehiscencia de anastomosis en una serie de 207 pacientes con CCR en

estadio II. La dehiscencia ocurrió en 12 (5,8%) pacientes, 5 (3,8%) casos correspondientes a cáncer de colon y 7 (9,2%) a cáncer de recto. La supervivencia acumulada a los 5 años libre de enfermedad fue significativamente peor en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia en comparación con los que no la habían presentado (58,3% vs. 88,7%; P<0,001). Al realizar el análisis de regresión logística de Cox, la dehiscencia de la anastomosis fue el único factor pronóstico. La razón de riesgo de los pacientes con dehiscencia en comparación con los que no la presentaron fue de 4,38 (IC95% 1,66-11,58; P=0,003), lo que indica que la dehiscencia aumentó el riesgo de recurrencia y de muerte relacionada con el cáncer más de 4 veces. Los autores concluyen que se deben realizar nuevos estudios en los que se investigue el beneficio de la quimioterapia adyuvante en pacientes con CCR en estadio II que han presentado una dehiscencia anastomótica. Del mismo modo, el mayor porcentaje de recurrencia en estadio III que presentan una infección peritoneal postoperatoria, a pesar de haber recibido en muchos casos quimioterapia, sugiere que es necesario considerar nuevos esquemas de tratamiento adyuvante que mejoren el pronóstico de estos pacientes.

Algunos de los estudios mencionados hasta ahora han incluido no sólo dehiscencias de anastomosis clínicas sino también dehiscencias subclínicas diagnosticadas en estudios radiológicos realizados de rutina. Sin embargo, muy pocos estudios han incluido pacientes con una infección peritoneal secundaria a un absceso sin dehiscencia. Este es otro de los aspectos que diferencia el presente estudio de la mayoría de los publicados hasta ahora. Sólo tres estudios anteriores consideraron también el absceso intraabdominal como un criterio de inclusión (131, 138, 207), uno de dichos estudios publicado recientemente por nuestro grupo. En el estudio de Eberhardt et al (207) que hemos mencionado anteriormente se realizó además del análisis global, un análisis por separado con el objetivo de investigar si la dehiscencia de anastomosis tenía un efecto diferente sobre la recurrencia y la mortalidad en comparación con el absceso intraabdominal. Los autores no encontraron diferencias. La recurrencia global a los 5 años fue 25,5% en el grupo de dehiscencia y 20,5% en el grupo de absceso

($P=0,59$). La recurrencia local también fue similar entre los dos grupos (8,3% vs. 14,8%; $p=0,63$). En un estudio retrospectivo con limitaciones metodológicas, Kressner et al (131) observaron que el absceso perineal en pacientes con amputaciones de recto se asoció a un mayor porcentaje de recurrencia local, pero no la infección intraabdominal. De nuevo, no realizamos este subanálisis debido al escaso número de pacientes en cada subgrupo (5 pacientes con peritonitis y 7 pacientes con absceso intraabdominal de los 12 que recurrieron en el grupo infección). Creemos que es razonable considerar la influencia de un absceso intraabdominal sobre el resultado oncológico puede ser significativa e incluso mayor que la de una dehiscencia radiológica en un paciente asintomático, especialmente cuando se considera que la respuesta inflamatoria está implicada en esta asociación.

6.5 Mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal postoperatoria y recurrencia tumoral

6.5.1 Efecto de la respuesta inflamatoria y angiogénica

Nuestro grupo ha estado dedicado en los últimos años al estudio de la respuesta inflamatoria secundaria a la infección como un factor asociado a la recurrencia tumoral. Hemos demostrado que un incremento en la concentración de IL-6 y VEGF en suero se asocia a un mayor riesgo de recurrencia tumoral tras cirugía de CCR (138). En el presente estudio hemos confirmado la amplificación de la respuesta inflamatoria y angiogénica en presencia de infección no sólo mediante la determinación de dichas citoquinas sino también mediante el análisis mediante arrays de anticuerpos de muchas otras implicadas en dichas respuestas. Sin embargo, en el análisis mediante regresión de Cox no hemos encontrado asociación con el resultado oncológico. Únicamente la concentración postoperatoria de VEGF se asoció a un mayor riesgo de recurrencia con tendencia a alcanzar la significación estadística.

Cabe mencionar que el tamaño muestral de nuestro estudio no fue calculado para detectar diferencias en la recurrencia tumoral, sino para comparar la respuesta inflamatoria entre pacientes infectados y pacientes sin complicaciones postoperatorias. En consecuencia, los pacientes que recurrieron fueron sólo 18 de una muestra de 94 pacientes, lo que representa un tamaño muestral muy limitado para una correcta estadística de parámetros relacionados con la recurrencia. Por este motivo, tomamos estos resultados negativos con cautela y no descartamos que a medida que nuestro modelo clínico vaya creciendo en tamaño puedan aparecer asociaciones significativas de éstos u otros parámetros con la recurrencia.

Los resultados de otros estudios han demostrado que la expresión de IL-6 preoperatoria se asocia a un peor resultado oncológico en el CCR. Concretamente, Chung y Chang (220) observan una asociación entre unos niveles elevados de IL-6 y un descenso de la supervivencia por cáncer. Incluso, Belluco et al (183) en una muestra de 208 pacientes con CCR encuentran que concentraciones superiores a 10 pg/ml es un factor independiente de mal pronóstico. Finalmente, la revisión de Knüpfer y Preiss (117), que incluye estos dos artículos, concluye que la expresión de IL-6 se asocia a un mayor tamaño tumoral, a un estadio tumoral más avanzado, a la presencia de ganglios linfáticos positivos y metástasis a distancia (117). Resultados parecidos se obtienen al analizar los valores de IL-6 y otros tipos de cáncer gastrointestinal (221, 222).

El impacto de la respuesta inflamatoria postoperatoria en los resultados oncológicos en CCR, no ha sido tan estudiada como los niveles de proteínas preoperatorias. Por ejemplo, McMillan et al (116) estudiaron la concentración de proteína C reactiva (PCR) a los 4 meses de la cirugía de CCR. Observaron que los pacientes con niveles elevados de PCR (> 5 mg/dl) presentaron una mayor recurrencia tumoral estadísticamente significativa. Más recientemente, Katoh et al (126) encuentran una asociación significativa entre niveles elevados de la PCR dos semanas después de la cirugía y un peor resultado oncológico en pacientes con cáncer de colon estadio II operados con intención curativa. Los resultados de

estos estudios apoyan nuestra hipótesis sobre la posible influencia de la respuesta inflamatoria postoperatoria en el resultado oncológico.

Por otra parte, existe un meta-análisis que incluye 20 artículos dónde se analiza el impacto de la determinación de VEGF preoperatorio en sangre en pacientes con CCR (223). Como sucede con la IL-6, parece que el VEGF tiene valor predictivo en el resultado oncológico. En esta publicación se concluye que niveles elevados de VEGF se asocian a un descenso de la supervivencia global y relacionada con cáncer. La sobreexpresión de VEGF se correlaciona con dos veces el riesgo de muerte. Los autores sugieren que el VEGF podría ser un biomarcador pronóstico de CCR, incluso podría guiar el tratamiento de pacientes, por ejemplo tras administración de Bevacizumab.

En la literatura, sólo hemos encontrado un estudio que valore el VEGF postoperatorio como factor pronóstico en CCR. Werther et al (224) en una muestra de 318 pacientes, observan que el valor de VEGF en suero y plasma a los 6 meses del postoperatorio no se asoció a la supervivencia global de los pacientes. Sin embargo, en el análisis multivariado, la combinación de un valor alto de CEA postoperatorio con un valor elevado de VEGF postoperatorio fue el mejor factor pronóstico de supervivencia global. En un estudio realizado por nuestro grupo, hemos observado que una concentración de VEGF en suero al cuarto día postoperatorio superior a 370 pg/ml aumentaba el riesgo de recurrencia hasta 5 veces en comparación con valores de VEGF inferiores. En el análisis multivariado de este estudio el VEGF sérico al cuarto día postoperatorio fue un factor pronóstico independiente de recurrencia (225). Estos resultados sugieren que el incremento de la angiogénesis postoperatoria podría ser también uno de los mecanismos responsables de la asociación entre infección y recurrencia en pacientes con CCR.

Una de nuestras hipótesis de trabajo, por tanto, sostiene que algunos de los componentes de la respuesta inflamatoria, de forma aislada o en combinación, son responsables de activar distintos mecanismos facilitadores de la recurrencia a

distintos niveles. Para dar respuesta a esta hipótesis y con la intención de identificar citoquinas –o bien, patrones de expresión de varias citoquinas- que pudieran estar implicadas en la facilitación de la recurrencia realizamos un estudio de expresión múltiple de citoquinas utilizando un sistema de arrays de anticuerpos. El objetivo específico fue correlacionar los valores de inducción de estas citoquinas con la presencia de respuesta inflamatoria, con la capacidad estimuladora de la invasividad por parte de diferentes muestras de suero y, finalmente, con la recurrencia tumoral. Analizar un cierto número de citoquinas con distintas propiedades funcionales podría adicionalmente aportar pistas valiosas sobre los mecanismos que actúan sobre las células tumorales residuales y su progresión a tumores recurrentes, particularmente si consideramos el mecanismo de recurrencia como multifactorial.

Quisimos estudiar si existía una asociación entre una determinada citoquina y la aparición de recurrencia tumoral o no (independientemente del grupo al que pertenecen, grupo infección o grupo control). Observamos una mayor detección de citoquinas inflamatorias y angiogénicas en los pacientes del grupo que recurrieron, pero en ningún caso se alcanzó la significación estadística. De nuevo, mencionar que nuestro modelo clínico no fue diseñado para detectar diferencias en la recurrencia tumoral. Inevitablemente, este tamaño de muestras puede acabar siendo limitante para desarrollar ciertos estudios estadísticos basados en un número de eventos pequeño, en este caso las 17 recurrencias estudiadas en los arrays de anticuerpos en el periodo de estudio.

Algunos grupos han estudiado anteriormente el valor de diferentes citoquinas mediante arrays de proteínas como predictoras de la enfermedad neoplásica. Por ejemplo, recientemente Chen et al (226) estudiaron 39 citoquinas circulantes en pacientes con CCR metastático observando que 17 de ellas (dónde se incluye el VEGF) son indicadores pronósticos de supervivencia global en estos pacientes. Incluso proponen una fórmula basado en estas citoquinas con valor pronóstico en los pacientes con CCR metastático. Otro ejemplo es la publicación de Kantola et al (227). Ellos estudiaron 27 citoquinas en sueros de pacientes con CCR y lo

compararon con los niveles séricos de pacientes sanos apareados por sexo y edad. El objetivo fue estudiar los niveles de citoquinas entre los grupos y observar si algún patrón de citoquinas daba información sobre el tumor. Observaron una elevación significativa de IL-6, IL-7, IL-8 y PDGF-BB en los pacientes con CCR respecto los controles sanos y un descenso significativo de la citoquina MCP-1. Además encontraron una asociación entre niveles bajos de IFN- γ y niveles altos de IL-8 e IL-1ra y la presencia de metástasis ganglionares. Estos dos estudios sugieren que determinadas citoquinas podrían estar en relación a la agresividad tumoral.

Kantola et al también realizaron un análisis de recurrencia sin encontrar asociación entre los niveles de citoquinas y recurrencia (que sucedió en 24 pacientes de los 79 que cumplieron el seguimiento). Ellos justifican este resultado al corto seguimiento realizado (24 meses) argumentando que no fue suficiente para poner de manifiesto una asociación entre una citoquina y la recurrencia tumoral (204).

Dada la variabilidad de nuestros resultados, como ya hemos mencionado, realizamos un análisis relativo entre los valores de citoquinas aumentados en los pacientes infectados respecto sus controles, en vez de considerar sus valores absolutos. Identificamos las citoquinas que se habían duplicado en los infectados respecto los controles y también las que se habían inducido más de 100 veces en cada infectado respecto a su control (figura 21). Observamos una gran variabilidad de expresión de citoquinas entre parejas dónde alguno de los pacientes (o ambos) habían presentado una recurrencia, así como una gran variabilidad en la magnitud de la inducción. Esta gran variabilidad conjuntamente con la baja recurrencia observada (18,9%), creemos que puede ser motivo de que ningún patrón de citoquina se asocie a la recurrencia tumoral en cada uno de los grupos. En ciertos casos, encontramos diversas citoquinas que son inducidas en el orden de miles de veces al comparar sueros postoperatorios de pacientes infectados respecto a sus controles apareados no infectados. Es pues, razonable que respuestas incrementadas de este tipo no tengan una relación funcional directa

con su posible efecto sobre la recurrencia tumoral, al mismo tiempo que podrían enmascarar patrones de expresión más relacionados con la recurrencia en pacientes que mostraron respuestas inflamatorias más moderadas. Asimismo, mientras que el tratamiento con concentraciones suprafisiológicas de IL-6 (50 ng/ml) estimula la invasividad de ciertas líneas celulares de CCR *in vitro*, este efecto es revertido si la concentración de IL-6 se eleva el doble (152). Podríamos especular que si los efectos particulares de ciertas citoquinas que favorecen la tumorigenidad estuvieran restringidos a un cierto rango de concentración, respuestas inflamatorias severas darían lugar a valores elevados en los niveles de estas citoquinas y no relacionados con la presencia de recurrencias tumorales.

A pesar de no haber detectado diferencias significativas entre los pacientes que recurren y los que no en determinadas citoquinas, vale la pena destacar que las dos primeras parejas de la gráfica (figura 21), dónde el infectado presentó una recurrencia, la inducción de citoquinas de éste respecto su control alcanzó más de 100 veces en la totalidad de las 43 citoquinas analizadas. Aunque este comentario no sea estadísticamente aceptable, este dato quizás es ilustrativo de una tendencia que aumentando el tamaño muestral podría dar lugar a algún resultado significativo.

Considerando las diferentes propiedades de las citoquinas (pleiotropía, redundancia, sinergismo y antagonismo) y su participación también en otros procesos a parte del cáncer; la agrupación de varias citoquinas podría tener implicaciones pronósticas en el cáncer. Una posible clasificación propuesta por Kantola et al (227) es identificar las citoquinas en función de si son sintetizadas por linfocitos T colaboradores Th1 o Th2. Clásicamente, los linfocitos Th1 son responsables de funciones de inmunidad celular destinadas a responder contra patógenos intracelulares. Los linfocitos Th2 están asociados a la respuesta inmune humoral y responden a patógenos extracelulares y están implicados en reacciones alérgicas. En respuesta a una enfermedad neoplásica, se ha descrito que la respuesta de los Th1 (representada por IL-12, IL-15 e INF γ) parece tener una actividad antitumoral mientras que la respuesta Th2 (representada por IL-4,

IL-5, IL-10 e IL-13) parece estar relacionada con la progresión tumoral. Los autores proponen que un ratio Th1 (en contra del tumor) / Th2 (a favor del tumor) <1 indicaría progresión tumoral.

Por todos estos motivos expuestos anteriormente, nuestros resultados en los arrays de anticuerpos deben ser interpretados con cautela. Pero también creemos que el análisis de estas citoquinas incluyendo más pacientes, y el estudio de citoquinas agrupándolas en función de diferentes características quizás podría dar lugar a variables pronósticas en pacientes con CCR.

Algunas de estas citoquinas ya han sido estudiadas por nuestro grupo y otros investigadores como promotoras de la diseminación tumoral (62, 63, 74, 75, 83, 138). Estos estudios podrían conducir a la identificación de moléculas solubles con un potencial valor predictivo de riesgo de recurrencia. Creemos que estos resultados podrían ser el punto de partida de nuevas líneas de investigación que consistirían en el estudio de otras citoquinas inflamatorias y angiogénicas que podrían ser pronósticas de infección intrabdominal o incluso de recurrencia tumoral.

6.5.2 Efecto de un medio inflamatorio sobre la capacidad de progresión de las células tumorales

Además de un aumento en la angiogénesis durante el periodo postoperatorio inmediato, los resultados del presente estudio señalan un mecanismo adicional por el que la infección peritoneal postoperatoria podría facilitar la recurrencia tumoral: el medio inflamatorio que se genera en respuesta a la infección podría actuar directamente sobre las células tumorales aumentando su capacidad de migración e invasión tisular tal y como se desprende de los ensayos *in vitro*.

Nuestro interés ha sido estudiar el efecto de una reacción inflamatoria en su conjunto sobre la biología de líneas celulares tumorales. Cabe destacar que esta aproximación global raramente ha sido realizada en el pasado, y mucho menos

utilizando muestras de pacientes en un modelo de cáncer. Existen no obstante muchos trabajos publicados donde se estudia el efecto de una o unas pocas citoquinas sobre la capacidad de proliferación, migración e invasión de líneas celulares *in vitro*. Gran parte de estos trabajos analizan los efectos del tratamiento con IL-6 considerada como la citoquina pro-inflamatoria universal. En particular, la IL-6 es especialmente interesante porque se encuentra sobreexpresada en el suero de pacientes con CCR (58, 59) y sus niveles han estado relacionados con el pronóstico de la enfermedad (62, 117). Además, la IL-6 exógena estimula la proliferación de células de carcinoma de diferentes orígenes y anticuerpos contra IL-6 revierten este efecto (147, 148, 228-234). Esta inducción de la proliferación celular parece aumentar al administrar una mayor concentración de IL-6 exógena (234). Además de sus efectos sobre la proliferación celular, la IL-6 ejerce también un efecto estimulador de la migración e invasión *in vitro* sobre líneas tumorales, en particular sobre líneas de cáncer de colon (149, 151, 152, 235). Todos estos resultados descritos en la literatura sugieren que una mayor respuesta inflamatoria, por ejemplo, secundaria a una infección intraabdominal postoperatoria, como nosotros hemos observado en nuestros resultados podría asociarse a una mayor actividad celular (proliferación, migración y/o invasión) que se relacionaría con una mayor recurrencia tumoral. Por otro lado, es de destacar que en varios de estos trabajos se describe la producción de IL-6 por las propias células tumorales, por lo que se propone que la IL-6 actúa mediante un mecanismo autocrino/paracrino estimulando la progresión tumoral.

Al margen de su posible acción autocrina/paracrina, la clara implicación de la IL-6 en la progresión tumoral del CCR es un precedente muy relevante para nuestra línea de investigación: por un lado nos proporciona un mecanismo básico por el que una citoquina pro-inflamatoria incrementa la tumorigenidad de células tumorales, y por otro lado abre la posibilidad a que estos efectos sean extensibles a una reacción inflamatoria en general, dada la participación de la IL-6 en la inflamación. En nuestro modelo de infección postoperatoria, disponemos de datos que apoyarían que el papel pro-tumorigénico de IL-6 está relacionado mecanísticamente con la reacción inflamatoria y no sólo como un mecanismo autocrino/paracrino propio del tumor. Por un lado, los niveles séricos de IL-6 se

inducen de manera importante después de la infección postoperatoria tanto en un modelo de ratones (137) como con muestras de pacientes (138). Por otro lado, estos niveles séricos se correlacionan de manera significativa con la recurrencia tumoral después de cirugía curativa de CCR y en los pacientes infectados (138). Por lo tanto, proponemos que la respuesta inflamatoria a la infección implica la liberación de factores solubles, presumiblemente citoquinas, que como en el caso descrito de IL-6 actuarían potenciando la tumorigenicidad de células residuales para dar lugar al incremento en la recurrencia tumoral. La similitud entre los mecanismos descritos en la literatura para IL-6 y nuestros resultados obtenidos a partir de sueros y líquidos peritoneales (proliferación, migración y/o invasión celulares) es un sólido argumento a favor de esta noción.

En algunos tipos tumorales, incluyendo el CCR, los efectos de la IL-6 sobre la proliferación celular sólo se observan en algunas líneas celulares mientras que en otras líneas no (152, 231, 234). Después de nuestra revisión, no hemos encontrado datos en la literatura sobre la sensibilidad de las líneas usadas en nuestro estudio a los efectos de la IL-6 (MDA-MB-231 y SW620), y nosotros tampoco disponemos de datos propios. De manera semejante, la estimulación de la invasión celular por IL-6 sólo ha sido observada en unas pocas líneas de cáncer de colon, como por ejemplo SW480 y HCT-116, mientras que en otras líneas como HT-29 no ejerce ningún efecto (152, 236). Estos datos constituyen una diferencia relevante con nuestros resultados ya que el efecto sobre la migración/invasión por efecto de sueros y líquidos peritoneales descrito en este trabajo ha sido reproducido por nosotros con posterioridad en otras líneas de cáncer de colon, entre ellas HT-29, sugiriendo pues que nuestros efectos no serían explicables sólo por la presencia de IL-6 en el medio inflamatorio de los pacientes infectados. En este sentido, y dado el claro efecto revertor de los anticuerpos anti-IL-6 descrito en la literatura, sería muy interesante determinar si estos anticuerpos – así como anticuerpos contra otras citoquinas, solos o en combinación – afectan también la actividad pro-migratoria/invasiva de los sueros y líquidos peritoneales provenientes de pacientes infectados. Experimentos de este tipo podrían ayudar a identificar al menos parte del patrón de citoquinas pro-invasivas contenidas en la respuesta a la infección postoperatoria.

De entre los escasos estudios donde se considera la reacción inflamatoria como un factor modulador de la tumorigenidad, y especialmente de la recurrencia después de cirugía con intención curativa, debemos destacar la línea de investigación del grupo de Whelan. A diferencia de los estudios *in vitro* mencionados antes, los ensayos del grupo de Whelan utilizan sueros de pacientes para los ensayos *in vitro* con células en cultivo. Este grupo, ha publicado el efecto de suero humano tras cirugía de CCR al aplicarlo a células endoteliales *in vitro*. Una de las líneas de investigación de este grupo es el estudio de los mecanismos por los cuáles aumenta la angiogénesis tras cirugía de CCR. Su hipótesis es que la angiogénesis es imprescindible en los procesos de cicatrización después de cirugía, pero que si por cualquier motivo la angiogénesis se prolonga o se intensifica podría ser un modulador positivo de la tumorigenidad. De esta manera, varios artículos analizan los niveles de diferentes citoquinas inflamatorias y angiogénicas en plasma de pacientes intervenidos de CCR (237-241). En la mayoría se observa un aumento de la citoquina justo en el postoperatorio precoz que los autores atribuyen a la respuesta inflamatoria aguda relacionada con la cirugía, después encuentran una elevación más o menos prolongada (dependiendo de la citoquina) de hasta 4 semanas y que los autores relacionan con el proceso de cicatrización. Finalmente los autores sugieren que un incremento a posteriori o una respuesta amplificada de estas citoquinas podría estar relacionada con una recurrencia tumoral incrementada a partir de células tumorales residuales. En conjunto, los autores demuestran que la respuesta inflamatoria a la cirugía posee un componente angiogénico que puede ponerse de manifiesto mediante el análisis en ensayos de angiogénesis *in vitro* del suero sanguíneo de pacientes operados (242, 243). Estos ensayos de angiogénesis incluyen el análisis de la proliferación, migración e invasión en cultivos de células endoteliales, así como de su capacidad para la formación de capilares en cultivo. En la publicación más reciente del grupo, estudian la actividad de células endoteliales al tratarlas con suero de pacientes en la semana 2 y 3 del postoperatorio de cirugía abierta de CCR. Los autores encuentran un aumento de la proliferación, migración e invasión de células endoteliales tanto en la segunda como en la tercera semana del postoperatorio, comparado con sueros extraídos en el preoperatorio, sobre una muestra de 53

pacientes. Concluyen que después de una resección de CCR mediante una laparotomía existe una inducción de factores angiogénicos, como mínimo hasta la semana 3 del postoperatorio, que estimularán la angiogénesis in vitro.

Finalmente en esta publicación, Kumara et al (242) comparan los resultados obtenidos con los resultados de una publicación anterior dónde analizan el efecto de estos sueros en células endoteliales en pacientes intervenidos por laparoscopia. No detectaron diferencias en proliferación celular según el abordaje quirúrgico. En cambio si observaron diferencias en migración celular pero sólo en la semana 3 del postoperatorio y en invasión celular en la semana 2 del postoperatorio, siendo mayor en el grupo de cirugía abierta. Los autores interpretan estos resultados como una mayor capacidad de inducir angiogénesis in vitro al responder a un mayor traumatismo que existe en la cirugía abierta. Sin embargo, ellos mismos anotan que en el estudio de cirugía abierta había más casos de resecciones anteriores de recto y amputaciones abdominoperineales que en el estudio de laparoscopia siendo mayor el traumatismo quirúrgico en estos procedimientos que en una hemicolectomía derecha o sigmoidectomía. Por lo que finalmente los autores concluyen que el efecto sobre la proliferación, migración e invasión de células endoteliales en cirugía abierta o laparoscópica del plasma es similar.

Es de destacar que en los grupos estudiados (242, 243) los autores incluyen todos los pacientes operados de CCR independientemente del curso postoperatorio inmediato. En el apartado de material y métodos los autores sólo excluyen muestras de pacientes inmunodeprimidos. Al describir los resultados clínicos a corto plazo, describen un 17% de morbilidad, siendo las complicaciones mayores una hemorragia de la anastomosis, una sepsis secundaria a una neumonía, un infarto de miocardio y finalmente un edema agudo de pulmón. Por lo que los autores incluyen pacientes que han presentado complicaciones y pacientes que no las han presentado. No realizan un análisis de subgrupos para valorar si una respuesta angiogénica exacerbada por una complicación secundaria a la cirugía podría modificar estos resultados.

En relación a estos trabajos, el estudio presentado en esta tesis doctoral va más allá al comparar los sueros (y también líquidos peritoneales) de pacientes que presentan una respuesta inflamatoria a la infección con sueros de pacientes que no han presentado ninguna complicación postoperatoria. Además, a pesar de que el grupo de investigación de Whelan propone que parte de la respuesta inflamatoria/angiogénica durante el postoperatorio es un factor a considerar como determinante de recurrencia tumoral, sus estudios funcionales se limitan a analizar la angiogénesis *in vitro*. En cambio, nuestro trabajo extiende el alcance de este modelo experimental al incorporar el análisis de las muestras postoperatorias sobre células tumorales en cultivo, permitiendo así un ensayo directo de las actividades celulares implicadas en la progresión tumoral. Además, apareamos nuestros casos y controles por la localización del tumor, lo que implica en cierta medida, la magnitud de la técnica quirúrgica requerida en cada enfermo y también apareamos por el abordaje quirúrgico. De esta forma, estas dos características de nuestro estudio no tendrían influencia en los resultados de la actividad celular *in vitro* como detecta el grupo de Whelan.

En base a estos resultados y a los de las investigaciones previas de nuestro grupo, proponemos que el mecanismo por el que la infección peritoneal postoperatoria y la consiguiente respuesta inflamatoria estimulan la recurrencia tumoral es multifactorial. Es concebible que una combinación de mecanismos – amplificación de angiogénesis, estimulación de la capacidad de migración e invasión de las células tumorales, y otros todavía por identificar, actúan en combinación para aumentar el riesgo de recurrencia.

6.6 Aplicabilidad clínica y futuras líneas de investigación

El presente estudio proporciona evidencias adicionales que apoyan la infección peritoneal postoperatoria como un factor que incrementa el riesgo de recurrencia en pacientes intervenidos de CCR con intención curativa. Algunos autores han sugerido (120, 126), y así también lo creemos nosotros (209), que estos pacientes podrían beneficiarse de la administración de tratamiento adyuvante

independientemente del estadio tumoral. Es evidente que, para que esta complicación se convierta en indicación de quimioterapia postoperatoria, se necesitan ensayos clínicos aleatorizados en los que se demuestre un beneficio. Hasta ahora no se ha realizado ningún estudio clínico de estas características.

Una de las posibles aplicaciones de nuestra línea de investigación es la identificación de biomarcadores con valor pronóstico en pacientes intervenidos de CCR con intención curativa. Estos biomarcadores permitirían seleccionar pacientes con un alto riesgo de recurrencia, con y sin infección peritoneal, que podrían beneficiarse de un seguimiento más intensivo y/o quimioterapia adyuvante independientemente del estadio tumoral. Aunque en el presente estudio no hemos observado asociación entre las concentración postoperatoria de IL-6 y VEGF y la recurrencia tumoral, varios estudios clínicos y experimentales previos realizados por nuestro grupo han demostrado que esas dos citoquinas son potenciales biomarcadores de recurrencia en pacientes operados de CCR, especialmente en aquellos que han presentado una infección peritoneal postoperatoria (137, 138, 225). El siguiente paso es validar el valor pronóstico de dichos biomarcadores en una serie independiente, algo que realizaremos próximamente en un estudio multicéntrico.

Aunque hemos identificado un perfil de citoquinas inflamatorias y angiogénicas asociado a la infección peritoneal, no hemos encontrado asociación con la recurrencia, por lo que el ensayo de arrays de anticuerpos todavía no ha proporcionado otros posibles biomarcadores que puedan ser validados y aplicados en la práctica clínica. Creemos que es necesario continuar investigando en una serie más larga de pacientes y a su vez estudiar potenciales combinaciones de concentraciones de citoquinas, con el objetivo de obtener resultados positivos con dichos ensayos.

Por otra parte, la investigación de los mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal postoperatoria y recurrencia tumoral puede permitir obtener no sólo biomarcadores con valor pronóstico sino también posibles dianas terapéuticas. En este sentido, se ha propuesto recientemente la IL-6 como una

potencial diana en los pacientes con CCR (244). En los últimos años, ensayos de cultivos celulares in vitro y experimentales con animales han encontrado evidencia suficiente de que el tratamiento con anticuerpos que bloquean la función de la IL-6 representan una estrategia prometedora contra diferentes cánceres (245, 246). Con los estudios de cáncer e inflamación se ha vuelto más aparente que terapias en contra de IL-6 no sólo actuarán en células malignas sinó que además romperán la interacción entre el tumor y el huésped en el microambiente tumoral. En los últimos años, se han desarrollado muchos anticuerpos monoclonales para inhibir las señales de la IL-6 en humanos (247). A pesar de los buenos resultados iniciales, la eficacia clínica de estas terapias debe ser evaluada con cautela. También es de interés, que mientras ensayos clínicos en cáncer han investigado el efecto de anticuerpos monoclonales que inhiben directamente la IL-6, también se ha observado que fármacos utilizados en la práctica diaria, específicamente terapias no inmunológicas incluyendo la aspirina (57) y los antiinflamatorios no esteroideos (248), son capaces de inhibir también las señales de IL-6.

El papel del VEGF está bien establecido en la promoción de la angiogénesis tumoral y la patogénesis del cáncer. A raíz de este comportamiento, se han diseñado una amplia gama de estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear esta citoquina u otros pasos del proceso angiogénico. Muchos de estos agentes se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos y otros ya se están utilizando en la práctica clínica. La evidencia médica actual apoya su administración en combinación con otro agente citostático en pacientes con CCR metastásico y no se acepta su uso en monoterapia. El Bevacizumab (de nombre comercial Avastin), aprobado en 2004 por la *Food and Drug Administration* (FDA) y en 2005 por la *European Medicines Agency* (EMA), es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF que se une y neutraliza todas las isoformas del VEGF. El Bevacizumab se acepta en combinación con otro citostático como primera línea de tratamiento en pacientes con CCR metastásico. El Aflibercept, otro agente anti-VEGF, se administra en combinación con un esquema FOLFORI como segunda línea en pacientes con CCR metastásico. De los inhibidores de tirosinas quinasas, sólo el Regorafenib se ha aceptado cuando fracasa el tratamiento citostático con terapia anti-VEGF y anti-EGFR (249). En resumen, los agentes antiangiogénicos

han ampliado las opciones terapéuticas de los pacientes con CCR metastático. En los pacientes con CCR no metastático, existen varios ensayos clínicos en fase II y III analizando el potencial terapéutico de los fármacos antiangiogénicos. Por ejemplo, Allegra et al han estudiado la combinación de un esquema FOLFOX modificado (12 sesiones cada 15 días de leucovorino, fluoracilo y oxaliplatino durante 6 meses y, en el grupo experimental se añadió Bevacizumab durante 1 año) como adyuvancia en pacientes con estadio II y III de CCR. Primero, demostraron que se trataba de una combinación quimioterápica segura y bien tolerada por los pacientes (250). Posteriormente, observaron que al añadir Bevacizumab al tratamiento adyuvante con FOLFOX modificado de pacientes estadio II y III de CCR mejoraba la supervivencia libre de recurrencia sólo durante la administración del tratamiento, pero esta mejoría desaparecía al cesar el tratamiento con Bevacizumab (251). El seguimiento a los 5 años no encontró diferencias en la supervivencia global entre los pacientes que recibieron quimioterapia combinada con Bevacizumab y los que sólo realizaron tratamiento adyuvante con FOLFOX modificado (252). Los autores hipotetizan que este efecto podría ser debido a un cambio en la biología del tumor transformándose en un fenotipo más agresivo o debido a que el uso de Bevacizumab en recidivas es menos efectivo. En cualquier caso, sería interesante investigar el efecto de la quimioterapia combinada con Bevacizumab en el grupo específico de pacientes que han presentado una infección peritoneal, ya que en estos pacientes la respuesta angiogénica está muy amplificada, tal y como hemos demostrado.

Como objetivo principal del presente trabajo experimental, hemos estudiado la actividad de células tumorales como otro de los mecanismos implicados en la recurrencia tumoral. El medio inflamatorio en suero y líquido peritoneal en respuesta a una infección intraabdominal actúa sobre la capacidad de diseminación de las células tumorales, estimulando la capacidad de migrar e invadir en líneas celulares *in vitro*. Nuestro modelo experimental sugiere que otro de los mecanismos por el cual se asocia la infección postoperatoria a la recurrencia es la mayor capacidad invasiva de las células tumorales residuales (253). Por un lado, se potencia la capacidad de diseminación de las células otorgándoles la capacidad de generar metástasis a distancia del lecho quirúrgico.

De esta forma, nuestros resultados concordarían con los autores que han publicado más recientemente la asociación entre dehiscencia de anastomosis y recurrencia sistémica (119, 126, 182). Por otro lado, las consecuencias que sobre la biología de células tumorales residuales pueda tener en el cambio fenotípico asociado a la invasividad celular está siendo investigado por nuestro grupo.

Las células iniciadoras de cáncer (CICs, *cancer-initiating cells*) forman una subpoblación de células tumorales indiferenciadas que expresan determinados antígenos que les confieren una capacidad de autorenovación suficiente para reproducir el tumor original cuando son aisladas. El antígeno más estudiado es el CD133 (254, 255) y más recientemente los antígenos CD44 y CD45; que conjuntamente potencian su capacidad de autorenovación (256). Estas células, que representan un porcentaje muy pequeño de toda la masa tumoral (<5%) (254), tienen una capacidad de supervivencia, migración e invasión superior a las células tumorales. Se ha sugerido que las células iniciadoras de cáncer podrían ser una diana terapéutica en los pacientes afectos de CCR (254-256). La adquisición de un fenotipo invasivo como mecanismo de recurrencia tumoral podría estar relacionada con la adquisición también de características del fenotipo de célula iniciadora de cáncer. Apoyando esta hipótesis, el tratamiento *in vitro* de células de CCR con la citoquina proinflamatoria IL-1 β induce un fenotipo de este tipo (257).

Además de continuar investigando la adquisición de un fenotipo invasivo por las células tumorales residuales en presencia de una infección peritoneal, hemos iniciado otra línea de investigación sobre el posible papel que cambios en el metabolismo de células tumorales residuales podrían tener en la recurrencia incrementada por el efecto de la respuesta inflamatoria a la infección. Como hemos comentado previamente (ver apartado 4.7.5.4), iniciamos los ensayos *in vitro* utilizando el kit comercial Cell Titer-Blue® Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, USA) que a través de la actividad oxidativa de las células permite su cuantificación. Este ensayo no fue válido para nuestro objetivo en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, los resultados iniciales demuestran una mayor actividad oxidativa *in vitro* en las líneas celulares MDA-

MB-231 y SW620 al aplicarles suero de pacientes que han presentado una infección postoperatoria respecto a los que no han presentado complicaciones después de cirugía de CCR. La caracterizaciónde cambios en la actividad metabólica de las células tumorales residuales podría permitir la identificación tanto de vías metabólicas como de metabolitos particulares con valor predictivo como biomarcadores de recurrencia y a su vez posibles dianas terapéuticas.

No sólo las propias células tumorales son objeto de investigación, sinó que algunos grupos han estudiado el papel de las células inflamatorias y estromales peritumorales que podrían ser responsables de la tumorigenidad de células tumorales residuales (57, 61, 62). Por ejemplo, se ha estudiado la presencia de macrófagos en el microambiente tumoral. Aunque existe controversia entre los diversos estudios realizados, parece que existe una asociación entre aumento de densidad de macrófagos en el margen tumoral y supervivencia y ausencia de metástasis (258). Sin embargo, un aumento de la densidad de macrófagos intratumorales se ha asociado a mayor invasión tumoral y presencia de ganglios linfáticos positivos (259). Por otro lado, recientemente Nagasaki et al han demostrado que existe una secreción de IL-6 por parte de fibroblastos relacionados con el tumor en condiciones de inflamación y en presencia de células tumorales. La síntesis de IL-6 por parte de fibroblastos asociados al tumor es incluso mayor que la de las propias células tumorales *in vitro* (260). Más recientemente, ha sido descrito un efecto inductor de VEGF en macrófagos asociados al tumor por parte de las células de cáncer de colon en un modelo experimental con ratones, efecto que parece ser esencial para el crecimiento tumoral (261). De esta manera, la interacción entre células tumorales y estromales también ha sido propuesta como una potencial diana terapéutica.

La investigación en los mecanismos de recurrencia asociados a la infección peritoneal postoperatoria es imperativa para mejorar el algoritmo terapéutico de los pacientes afectos de CCR, con el fin de mejorar su supervivencia.

7 CONCLUSIONES

- La infección peritoneal postoperatoria induce un incremento en la expresión de IL-6 y VEGF en suero de pacientes con CCR intervenidos con intención curativa. El incremento en la concentración de estas citoquinas refleja un aumento de la respuesta inflamatoria y angiogénica en estos pacientes.
- Los sueros de pacientes que han sufrido una infección peritoneal postoperatoria inducen un incremento en la expresión de otras citoquinas pro y antiinflamatorias y pro y antiangiogénicas en comparación con los pacientes que no han presentado ninguna complicación.
- El suero de pacientes que han sufrido una infección peritoneal inducen una mayor capacidad de proliferación y migración de las células MDA-MB-231 *in vitro*.
- El líquido peritoneal de pacientes que han sufrido una infección peritoneal induce una mayor capacidad de migración de las células MDA-MB-231 y de invasión de las células SW620 *in vitro*.
- La infección peritoneal postoperatoria se asocia a una mayor recurrencia tumoral global y consecuentemente a una menor supervivencia libre de enfermedad. La supervivencia global es significativamente menor en los pacientes que presentan una infección peritoneal postoperatoria.

Por tanto, el medio inflamatorio en suero y líquido peritoneal en respuesta a una infección intrabdominal actúa sobre la capacidad de diseminación de las células tumorales, estimulando la capacidad de migrar e invadir de células tumorales *in vitro*. Esta adquisición de migrar o invadir de las células tumorales en un ambiente inflamatorio creemos que puede ser uno de los mecanismos responsables en la asociación entre infección peritoneal y recurrencia tumoral *in vivo*.

8 ANEXOS

8.1 Información para el paciente

Infección peritoneal perioperatoria y recurrencia del cáncer colorrectal: Estudio de la respuesta inflamatoria de fase aguda y de la respuesta angiogénica sistémica y local.

Este documento tiene por objeto pedirle su consentimiento para ser incluido en un estudio encaminado a analizar el efecto que la infección intraabdominal, presente durante la intervención quirúrgica o en el postoperatorio inmediato, pueda tener sobre la respuesta inflamatoria y sobre la capacidad de formar vasos en pacientes con cáncer de intestino grueso.

El cáncer de intestino grueso es frecuente entre la población adulta y su único tratamiento consiste en la extirpación quirúrgica de aquella parte del intestino donde se localiza el tumor. La intervención que le vamos a realizar, es una intervención mayor, y cómo tal, puede ocurrir que en el postoperatorio surja alguna complicación entre las que hay que considerar las que provocan infección.

A pesar de que este tipo de complicaciones aparecen normalmente hasta en un 20% de los casos, no conocemos completamente la respuesta de nuestro organismo a las mismas. Se ha sugerido que la inflamación general y local que puede causar una complicación de este tipo, puede ser mayor que en los casos que no existe ninguna de estas complicaciones. Del mismo modo, la respuesta inflamatoria es mayor en aquellos pacientes con cáncer de colon operados de urgencias con peritonitis.

Nosotros creemos que esa mayor inflamación podría dar lugar a una mayor producción de sustancias necesarias para el crecimiento de los tumores. Sin embargo, para demostrar esto es necesario realizar un estudio como el que proponemos.

Es caso de que usted acepte participar en este estudio y una vez realizada la intervención se realizarán durante los siguientes 5 días, 5 extracciones de 10 cc de sangre para la determinación de varias sustancias. Asimismo, antes de finalizar la intervención se dejará un tubo de drenaje dentro del abdomen que se retirará al cuarto día del postoperatorio, tal y como hacemos habitualmente en este tipo de intervenciones. Durante esos días se obtendrán muestras del líquido que salga a través del tubo.

Estos procedimientos no van a interferir en la normal asistencia al paciente y no le representarán molestias ni riesgos adicionales. Usted no obtendrá ningún beneficio inmediato de la participación en este estudio. Sin embargo, la información obtenida puede permitir conocer mejor la influencia que pueda tener la aparición de complicaciones en la evolución de los pacientes operados por cáncer de colon.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de retirarse del estudio en cualquier momento si así lo cree conveniente, sin tener que especificar los motivos, y sin que su decisión perjudique en el futuro la atención médica que merece.

Toda la información resultante de su participación en el estudio será almacenada y analizada en un ordenador y se tratará de forma confidencial según la legislación vigente. Los resultados de este estudio pueden ser publicados en revistas médicas. Sin embargo, su nombre no aparecerá en ningún documento. Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del IMAS.

8.2 Consentimiento informado

Información peritoneal perioperatoria y recurrencia del cáncer colorrectal:

Estudio de la respuesta inflamatoria de fase aguda y de la respuesta angiogénica sistémica y local.

Yo (nombre y apellidos en mayúsculas)

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con: (nombre del investigador en mayúsculas)

Comprendo que:

1. Mi participación es voluntaria
2. Que no me supone ningún beneficio directo
3. Que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos
4. Que la información obtenida de este estudio es confidencial

Autorizo mi inclusión en este estudio

Fecha

Firma del participante

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Lopez-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz C, Chirlaque MD. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 3:iii76-82.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013 Apr;49(6):1374-403.
3. INEBASE Defunciones según la causa de muerte 2012 (consultado 5/6/2014) Disponible en:
<http://wwwinees/jaxi/tablado?path=/t15/p417/a2012/l0/&file=01001px&type=pcaxis&L=0>.
4. Cabanes A, Vidal E, Aragones N, Perez-Gomez B, Pollan M, Lope V, et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 3:iii14-20.
5. F.H. Netter, editor. *Atlas de Anatomía Humana.* Editorial Masson ed2007; 4a edición.
6. Lanza G, Messerini L, Gafa R, Risio M. Colorectal tumors: the histology report. *Dig Liver Dis.* 2011 Mar;43 Suppl 4:S344-55.
7. Hugen N, van Beek JJ, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Insight into Mucinous Colorectal Carcinoma: Clues from Etiology. *Ann Surg Oncol.* 2014 Apr 12.
8. Bosman F. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th edn. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2010.
9. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):979-94.
10. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003 Apr;16(4):376-88.
11. Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzi S, Iusco D, Ghermandi C, et al. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol.* 2013 Nov 7;19(41):6979-94.
12. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014 Apr 26;383(9927):1490-502.

13. Leufkens AM, van den Bosch MA, van Leeuwen MS, Siersema PD. Diagnostic accuracy of computed tomography for colon cancer staging: a systematic review. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Jul;46(7-8):887-94.
14. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. AJCC cancer staging manual (7th ed). New York, NY:Springer. 2010.
15. Sabin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 2010 Nov 15;116(22):5336-9.
16. Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Apr 18;93(8):583-96.
17. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*. 1986 Jun 28;1(8496):1479-82.
18. Pera M, Pascual M. [Quality standards in rectal cancer surgery]. *Gastroenterol Hepatol*. 2005 Aug-Sep;28(7):417-25.
19. Quirke P, Dixon MF. The prediction of local recurrence in rectal adenocarcinoma by histopathological examination. *Int J Colorectal Dis*. 1988 Jun;3(2):127-31.
20. Birbeck KF, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons W, Dixon MF, Mapstone NP, et al. Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Ann Surg*. 2002 Apr;235(4):449-57.
21. Hermanek P, Hermanek P, Hohenberger W, Klumpfinger M, Kockerling F, Papadopoulos T. The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. *Int J Colorectal Dis*. 2003 Jul;18(4):335-41.
22. Nicholls RJ, Hall C. Treatment of non-disseminated cancer of the lower rectum. *Br J Surg*. 1996 Jan;83(1):15-8.
23. Hazebroek EJ. COLOR: a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open resection for colon cancer. *Surg Endosc*. 2002 Jun;16(6):949-53.
24. van der Pas MH, Haglind E, Cuesta MA, Furst A, Lacy AM, Hop WC, et al. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer (COLOR II): short-term outcomes of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013 Mar;14(3):210-8.
25. Green BL, Marshall HC, Collinson F, Quirke P, Guillou P, Jayne DG, et al. Long-term follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of conventional versus laparoscopically assisted resection in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2013 Jan;100(1):75-82.

26. Kuhry E, Schwenk W, Gaupset R, Romild U, Bonjer J. Long-term outcome of laparoscopic surgery for colorectal cancer: a cochrane systematic review of randomised controlled trials. *Cancer Treat Rev.* 2008 Oct;34(6):498-504.
27. Bianchi PP, Petz W, Luca F, Biffi R, Spinoglio G, Montorsi M. Laparoscopic and Robotic Total Mesorectal Excision in the Treatment of Rectal Cancer. Brief Review and Personal Remarks. *Front Oncol.* 2014;4:98.
28. Hompes R, Arnold S, Warusavitarne J. Towards the safe introduction of transanal total mesorectal excision: the role of a clinical registry. *Colorectal Dis.* 2014 Jul;16(7):498-501.
29. Atallah S, Martin-Perez B, Albert M, deBeche-Adams T, Nassif G, Hunter L, et al. Transanal minimally invasive surgery for total mesorectal excision (TAMIS-TME): results and experience with the first 20 patients undergoing curative-intent rectal cancer surgery at a single institution. *Tech Coloproctol.* 2013 May;18(5):473-80.
30. de Lacy AM, Rattner DW, Adelsdorfer C, Tasende MM, Fernandez M, Delgado S, et al. Transanal natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) rectal resection: "down-to-up" total mesorectal excision (TME)--short-term outcomes in the first 20 cases. *Surg Endosc.* 2013 Sep;27(9):3165-72.
31. Young PE, Womeldorf CM, Johnson EK, Maykel JA, Brucher B, Stojadinovic A, et al. Early detection of colorectal cancer recurrence in patients undergoing surgery with curative intent: current status and challenges. *J Cancer.* 2014;5(4):262-71.
32. Lan YT, Chang SC, Yang SH, Lin CC, Wang HS, Jiang JK, et al. Comparison of clinicopathological characteristics and prognosis between early and late recurrence after curative surgery for colorectal cancer. *Am J Surg.* 2013 Jun;207(6):922-30.
33. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol.* 2012 Oct;23(10):2479-516.
34. Benedix F, Meyer F, Kube R, Gastinger I, Lippert H. [Right- and left-sided colonic cancer - different tumour entities]. *Zentralbl Chir.* 2010 Aug;135(4):312-7.
35. Derwinger K, Gustavsson B. Variations in demography and prognosis by colon cancer location. *Anticancer Res.* 2011 Jun;31(6):2347-50.
36. Jess P, Hansen IO, Gamborg M, Jess T. A nationwide Danish cohort study challenging the categorisation into right-sided and left-sided colon cancer. *BMJ Open.* 2013;3(5).

37. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 20;29(33):4401-9.
38. Benedix F, Schmidt U, Mroczkowski P, Gastinger I, Lippert H, Kube R. Colon carcinoma--classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite?--Analysis of 29,568 patients. *Eur J Surg Oncol.* 2011 Feb;37(2):134-9.
39. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J.* 2012 Jun;59(6):A4444.
40. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Oct 6;96(19):1420-5.
41. Hugen N, van de Velde CJ, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):651-7.
42. Leopoldo S, Lorena B, Cinzia A, Gabriella DC, Angela Luciana B, Renato C, et al. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol.* 2008 May;15(5):1429-39.
43. Chapuis PH, Dent OF, Bokey EL, Newland RC, Sinclair G. Adverse histopathological findings as a guide to patient management after curative resection of node-positive colonic cancer. *Br J Surg.* 2004 Mar;91(3):349-54.
44. Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Koorey SG, Zelas PJ, et al. Factors affecting survival after excision of the rectum for cancer: a multivariate analysis. *Dis Colon Rectum.* 1997 Jan;40(1):3-10.
45. Gatta G, Capocaccia R, Sant M, Bell CM, Coebergh JW, Damhuis RA, et al. Understanding variations in survival for colorectal cancer in Europe: a EUROCARE high resolution study. *Gut.* 2000 Oct;47(4):533-8.
46. Brenner H, Bouvier AM, Foschi R, Hackl M, Larsen IK, Lemmens V, et al. Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EUROCARE study. *Int J Cancer.* 2012 Oct 1;131(7):1649-58.
47. Lan YT, Yang SH, Chang SC, Liang WY, Li AF, Wang HS, et al. Analysis of the seventh edition of American Joint Committee on colon cancer staging. *Int J Colorectal Dis.* 2012 May;27(5):657-63.
48. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol.* 2010 Jan 10;28(2):264-71.

49. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart A. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end results and rectal pooled analysis outcomes. *J Clin Oncol.* 2010 Jan 10;28(2):256-63.
50. van Wyk HC, Roxburgh CS, Horgan PG, Foulis AF, McMillan DC. The detection and role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival in patients with node negative operable primary colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014 Apr;90(1):77-90.
51. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Oct;133(10):1539-51.
52. Liebig C, Ayala G, Wilks J, Verstovsek G, Liu H, Agarwal N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5131-7.
53. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer.* 2009 Aug 1;115(15):3379-91.
54. Onate-Ocana LF, Montesdeoca R, Lopez-Graniel CM, Aiello-Crocifoglio V, Mondragon-Sanchez R, Cortina-Borja M, et al. Identification of patients with high-risk lymph node-negative colorectal cancer and potential benefit from adjuvant chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2004 Jun;34(6):323-8.
55. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001 Feb 17;357(9255):539-45.
56. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
57. Djaldetti M, Bessler H. Modulators affecting the immune dialogue between human immune and colon cancer cells. *World J Gastrointest Oncol.* 2014 May 15;6(5):129-38.
58. Bessler H, Djaldetti M. Role of the equilibrium between colon cancer and mononuclear cells in cytokine production. *Biomed Pharmacother.* 2010 Dec;64(10):706-11.
59. Brozek W, Bises G, Girsch T, Cross HS, Kaiser HE, Peterlik M. Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression. *Eur J Cancer.* 2005 Oct;41(15):2347-54.
60. Heikkila K, Ebrahim S, Lawlor DA. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer.* 2008 May;44(7):937-45.
61. Guthrie GJ, Roxburgh CS, Richards CH, Horgan PG, McMillan DC. Circulating IL-6 concentrations link tumour necrosis and systemic and local

inflammatory responses in patients undergoing resection for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013 Jul 9;109(1):131-7.

62. Guthrie GJ, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC. Does interleukin-6 link explain the link between tumour necrosis, local and systemic inflammatory responses and outcome in patients with colorectal cancer? *Cancer Treat Rev*. 2013 Feb;39(1):89-96.

63. McMillan DC, Crozier JE, Canna K, Angerson WJ, McArdle CS. Evaluation of an inflammation-based prognostic score (GPS) in patients undergoing resection for colon and rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Aug;22(8):881-6.

64. McMillan DC. The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: a decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013 Aug;39(5):534-40.

65. Mauriz JL, Linares P, Gonzalez P, Culebras JM. Antiangiogenic treatment of cancer. *Cir Esp*. 2005 Jul;78(1):3-11.

66. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*. 1972 Mar;175(3):409-16.

67. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298-307.

68. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

69. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149185.

70. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):353-64.

71. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life*. 2001 Jul;52(1-2):61-6.

72. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 10;23(5):1011-27.

73. Hanrahan V, Currie MJ, Cunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol*. 2003 Jun;200(2):183-94.

74. Martins SF, Reis RM, Rodrigues AM, Baltazar F, Filho AL. Role of endoglin and VEGF family expression in colorectal cancer prognosis and anti-angiogenic therapies. *World J Clin Oncol*. 2011 Jun 10;2(6):272-80.

75. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebreeze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2004 Feb;17(2):197-203.
76. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1043-6.
77. Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Huget P, Goovaerts G, Weyler J, Lardon F, et al. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1999 Jan;79(2):316-22.
78. Yan G, Zhou XY, Cai SJ, Zhang GH, Peng JJ, Du X. Lymphangiogenic and angiogenic microvessel density in human primary sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008 Jan 7;14(1):101-7.
79. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995 Sep 15;55(18):3964-8.
80. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg.* 1995 Dec;222(6):695-9.
81. Zlobec I, Steele R, Compton CC. VEGF as a predictive marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy. *Cancer.* 2005 Dec 1;104(11):2517-21.
82. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer.* 2006 Jun 19;94(12):1823-32.
83. De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E, et al. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer.* 2004 Jan 15;100(2):270-8.
84. Eldesoky A, Shouma A, Mosaad Y, Elhawary A. Clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in patients with colorectal cancer. *Saudi J Gastroenterol.* 2011 May-Jun;17(3):170-3.
85. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Baibas N, Polychronidis A, Simopoulos C, et al. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and the effect of tumor surgery. *Surgery.* 2002 May;131(5):548-55.
86. Svendsen MN, Werther K, Christensen IJ, Basse L, Nielsen HJ. Influence of open versus laparoscopically assisted colectomy on soluble vascular endothelial growth factor (sVEGF) and its soluble receptor 1 (sVEGFR1). *Inflamm Res.* 2005 Nov;54(11):458-63.

87. Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, Haerting J, Unverzagt S. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2009(3):CD005392.
88. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. J Natl Cancer Inst. 2007 Mar 21;99(6):433-41.
89. Li Destri G, Di Carlo I, Scilletta R, Scilletta B, Puleo S. Colorectal cancer and lymph nodes: the obsession with the number 12. World J Gastroenterol. 2014 Feb 28;20(8):1951-60.
90. Kapiteijn E, Putter H, van de Velde CJ. Impact of the introduction and training of total mesorectal excision on recurrence and survival in rectal cancer in The Netherlands. Br J Surg. 2002 Sep;89(9):1142-9.
91. van de Velde CJ, van den Broek CB. Quality assurance in rectal cancer treatment. Dig Dis. 2012;30 Suppl 2:126-31.
92. Havenga K, Enker WE, Norstein J, Moriya Y, Heald RJ, van Houwelingen HC, et al. Improved survival and local control after total mesorectal excision or D3 lymphadenectomy in the treatment of primary rectal cancer: an international analysis of 1411 patients. Eur J Surg Oncol. 1999 Aug;25(4):368-74.
93. Wibe A, Rendedal PR, Svensson E, Norstein J, Eide TJ, Myrvold HE, et al. Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. Br J Surg. 2002 Mar;89(3):327-34.
94. Hall NR, Finan PJ, al-Jaberi T, Tsang CS, Brown SR, Dixon MF, et al. Circumferential margin involvement after mesorectal excision of rectal cancer with curative intent. Predictor of survival but not local recurrence? Dis Colon Rectum. 1998 Aug;41(8):979-83.
95. Zirngibl H, Husemann B, Hermanek P. Intraoperative spillage of tumor cells in surgery for rectal cancer. Dis Colon Rectum. 1990 Jul;33(7):610-4.
96. Sondenaa K, Quirke P, Hohenberger W, Sugihara K, Kobayashi H, Kessler H, et al. The rationale behind complete mesocolic excision (CME) and a central vascular ligation for colon cancer in open and laparoscopic surgery : proceedings of a consensus conference. Int J Colorectal Dis. 2014 Apr;29(4):419-28.
97. West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. J Clin Oncol. 2010 Jan 10;28(2):272-8.
98. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. Colorectal Dis. 2009 May;11(4):354-64; discussion 64-5.

99. Killeen S, Mannion M, Devaney A, Winter DC. Complete mesocolic resection and extended lymphadenectomy for colon cancer: a systematic review. *Colorectal Dis.* 2014 Aug;16(8):577-94.
100. Park IJ, Choi GS, Lim KH, Kang BM, Jun SH. Multidimensional analysis of the learning curve for laparoscopic colorectal surgery: lessons from 1,000 cases of laparoscopic colorectal surgery. *Surg Endosc.* 2009 Apr;23(4):839-46.
101. Kang CY, Halabi WJ, Luo R, Pigazzi A, Nguyen NT, Stamos MJ. Laparoscopic colorectal surgery: a better look into the latest trends. *Arch Surg.* 2012 Aug;147(8):724-31.
102. Chachkhiani I, Gurlich R, Maruna P, Frasko R, Lindner J. The postoperative stress response and its reflection in cytokine network and leptin plasma levels. *Physiol Res.* 2005;54(3):279-85.
103. Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg.* 1996 Aug;83(8):1031-6.
104. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg.* 1996 Nov;224(5):647-64.
105. Parry-Billings M, Baigrie RJ, Lamont PM, Morris PJ, Newsholme EA. Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels. *Arch Surg.* 1992 Oct;127(10):1237-40.
106. Ugras B, Giris M, Erbil Y, Gokpinar M, Citlak G, Issever H, et al. Early prediction of anastomotic leakage after colorectal surgery by measuring peritoneal cytokines: prospective study. *Int J Surg.* 2008 Feb;6(1):28-35.
107. Chuang D, Paddison JS, Booth RJ, Hill AG. Differential production of cytokines following colorectal surgery. *ANZ J Surg.* 2006 Sep;76(9):821-4.
108. Badia JM, Whawell SA, Scott-Coombes DM, Abel PD, Williamson RC, Thompson JN. Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br J Surg.* 1996 Mar;83(3):347-8.
109. Pascual M, Alonso S, Pares D, Courtier R, Gil MJ, Grande L, et al. Randomized clinical trial comparing inflammatory and angiogenic response after open versus laparoscopic curative resection for colonic cancer. *Br J Surg.* 2011 Jan;98(1):50-9.
110. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg.* 1992 Aug;79(8):757-60.
111. Vittimberga FJ, Jr., Foley DP, Meyers WC, Callery MP. Laparoscopic surgery and the systemic immune response. *Ann Surg.* 1998 Mar;227(3):326-34.

112. Pera M, Nelson H, Rajkumar SV, Young-Fadok TM, Burgart LJ. Influence of postoperative acute-phase response on angiogenesis and tumor growth: open vs. laparoscopic-assisted surgery in mice. *J Gastrointest Surg.* 2003 Sep-Oct;7(6):783-90.
113. Zhu P, Jiang H, Fu J, Chen W, Wang Z, Cui L. Cytokine levels in abdominal exudate predict prolonged postoperative ileus following surgery for colorectal carcinoma. *Oncol Lett.* 2013 Sep;6(3):835-9.
114. Miki C, Tanaka K, Inoue Y, Araki T, Ohi M, Mohri Y, et al. Perioperative host-tumor inflammatory interactions: a potential trigger for disease recurrence following a curative resection for colorectal cancer. *Surg Today.* 2008;38(7):579-84.
115. Herwig R, Glodny B, Kuhle C, Schluter B, Brinkmann OA, Strasser H, et al. Early identification of peritonitis by peritoneal cytokine measurement. *Dis Colon Rectum.* 2002 Apr;45(4):514-21.
116. McMillan DC, Wotherspoon HA, Fearon KC, Sturgeon C, Cooke TG, McArdle CS. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg.* 1995 Oct;170(4):319-22.
117. Knupfer H, Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *Int J Colorectal Dis.* 2010 Feb;25(2):135-40.
118. Bondestam J, Salven P, Jaaskela-Saari H, Ikonen T, Lepantalo M, Mattila S, et al. Major surgery increases serum levels of vascular endothelial growth factor only temporarily. *Am J Surg.* 2000 Jan;179(1):57-9.
119. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW, Seto CL. Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patients after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg.* 2007 Jan;11(1):8-15.
120. Mirnezami A, Mirnezami R, Chandrakumaran K, Sasapu K, Sagar P, Finan P. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2011 May;253(5):890-9.
121. Phitayakorn R, Delaney CP, Reynolds HL, Champagne BJ, Heriot AG, Neary P, et al. Standardized algorithms for management of anastomotic leaks and related abdominal and pelvic abscesses after colorectal surgery. *World J Surg.* 2008 Jun;32(6):1147-56.
122. Snijders HS, Wouters MW, van Leersum NJ, Kolfschoten NE, Henneman D, de Vries AC, et al. Meta-analysis of the risk for anastomotic leakage, the postoperative mortality caused by leakage in relation to the overall postoperative mortality. *Eur J Surg Oncol.* 2012 Nov;38(11):1013-9.

123. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg.* 2004 Aug;240(2):255-9.
124. Kube R, Mroczkowski P, Granowski D, Benedix F, Sahm M, Schmidt U, et al. Anastomotic leakage after colon cancer surgery: a predictor of significant morbidity and hospital mortality, and diminished tumour-free survival. *Eur J Surg Oncol.* 2010 Feb;36(2):120-4.
125. Bell SW, Walker KG, Rickard MJ, Sinclair G, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage after curative anterior resection results in a higher prevalence of local recurrence. *Br J Surg.* 2003 Oct;90(10):1261-6.
126. Katoh H, Yamashita K, Wang G, Sato T, Nakamura T, Watanabe M. Anastomotic leakage contributes to the risk for systemic recurrence in stage II colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2011 Jan;15(1):120-9.
127. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg.* 2005 Sep;92(9):1150-4.
128. Ptak H, Marusch F, Meyer F, Schubert D, Gastinger I, Lippert H. Impact of anastomotic leakage on oncological outcome after rectal cancer resection. *Br J Surg.* 2007 Dec;94(12):1548-54.
129. den Dulk M, Marijnen CA, Collette L, Putter H, Pahlman L, Folkesson J, et al. Multicentre analysis of oncological and survival outcomes following anastomotic leakage after rectal cancer surgery. *Br J Surg.* 2009 Sep;96(9):1066-75.
130. Eriksen MT, Wibe A, Norstein J, Haffner J, Wiig JN. Anastomotic leakage following routine mesorectal excision for rectal cancer in a national cohort of patients. *Colorectal Dis.* 2005 Jan;7(1):51-7.
131. Kressner U, Graf W, Mahteme H, Pahlman L, Glimelius B. Septic complications and prognosis after surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2002 Mar;45(3):316-21.
132. Gertsch P, Baer HU, Kraft R, Maddern GJ, Altermatt HJ. Malignant cells are collected on circular staplers. *Dis Colon Rectum.* 1992 Mar;35(3):238-41.
133. Sayfan J, Averbuch F, Koltun L, Benyamin N. Effect of rectal stump washout on the presence of free malignant cells in the rectum during anterior resection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2000 Dec;43(12):1710-2.
134. Basha G, Penninckx F. Exfoliated tumour cells and locally recurrent colorectal cancer. *Acta Chir Belg.* 1996 Apr;96(2):66-70.
135. Umpleby HC, Fermor B, Symes MO, Williamson RC. Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg.* 1984 Sep;71(9):659-63.

136. Merkel S, Wang WY, Schmidt O, Dworak O, Wittekind C, Hohenberger W, et al. Locoregional recurrence in patients with anastomotic leakage after anterior resection for rectal carcinoma. *Colorectal Dis.* 2001 May;3(3):154-60.
137. Bohle B, Pera M, Pascual M, Alonso S, Mayol X, Salvado M, et al. Postoperative intra-abdominal infection increases angiogenesis and tumor recurrence after surgical excision of colon cancer in mice. *Surgery.* 2010 Jan;147(1):120-6.
138. Alonso S, Pascual M, Salvans S, Mayol X, Mojáil S, Gil MJ, et al. Postoperative intra-abdominal infection and colorectal cancer recurrence: a prospective matched cohort study of inflammatory and angiogenic response as mechanisms involved in this association. *European Journal of Surgical Oncology.* 2014;(en prensa).
139. Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg.* 1995 Apr;130(4):387-93.
140. Katharina P. Tumor cell seeding during surgery-possible contribution to metastasis formations. *Cancers (Basel).* 2011;3(2):2540-53.
141. Castells A, Boix L, Bessa X, Gargallo L, Pique JM. Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(10):1368-72.
142. Thorsteinsson M, Jess P. The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer--a review. *Eur J Surg Oncol.* 2011 Jun;37(6):459-65.
143. Akagi Y, Kinugasa T, Adachi Y, Shirouzu K. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year studies. *Mol Clin Oncol.* 2013 Jul;1(4):582-92.
144. Finlay IG, McArdle CS. Occult hepatic metastases in colorectal carcinoma. *Br J Surg.* 1986 Sep;73(9):732-5.
145. Leen E. The detection of occult liver metastases of colorectal carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1999;6(1):7-15.
146. Satsu H, Ishimoto Y, Nakano T, Mochizuki T, Iwanaga T, Shimizu M. Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor-alpha. *Exp Cell Res.* 2006 Nov 15;312(19):3909-19.
147. Iglesias M, Plowman GD, Woodworth CD. Interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor regulate proliferation of normal, human papillomavirus-immortalized, and carcinoma-derived cervical cells in vitro. *Am J Pathol.* 1995 Apr;146(4):944-52.

148. Miki S, Iwano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, et al. Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett.* 1989 Jul 3;250(2):607-10.
149. Chuang JY, Huang YL, Yen WL, Chiang IP, Tsai MH, Tang CH. Syk/JNK/AP-1 signaling pathway mediates interleukin-6-promoted cell migration in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):545-59.
150. Ito R, Yasui W, Yokozaki H, Yamashita U, Takata T, Nikai H, et al. Growth stimulatory effect of interleukin (IL)-1 alpha produced by oral squamous carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 1997 Oct;11(4):807-12.
151. Lin YM, Chang ZL, Liao YY, Chou MC, Tang CH. IL-6 promotes ICAM-1 expression and cell motility in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2013 Jan 1;328(1):135-43.
152. Hsu CP, Chung YC. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2006 Nov-Dec;26(6B):4607-14.
153. Gil-Egea MJ, Martinez MA, Sanchez M, Bonilla M, Lasso C, Trillo L, et al. [Multimodal rehabilitation programme in elective colorectal surgery. Development of a clinical pathway and preliminary results]. *Cir Esp.* 2008 Nov;84(5):251-5.
154. Salvans S, Gil-Egea MJ, Martinez-Serrano MA, Bordoy E, Perez S, Pascual M, et al. [Multimodal (fast-track) rehabilitation in elective colorectal surgery: evaluation of the learning curve with 300 patients]. *Cir Esp.* 2010 Aug;88(2):85-91.
155. Salvans S, Gil-Egea MJ, Pera M, Lorente L, Cots F, Pascual M, et al. [Multimodal rehabilitation program in elective colorectal surgery: Impact on hospital costs]. *Cir Esp.* 2013 Dec;91(10):638-44.
156. Landegren U. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods.* 1984 Mar 16;67(2):379-88.
157. Givens KT, Kitada S, Chen AK, Rothschilder J, Lee DA. Proliferation of human ocular fibroblasts. An assessment of in vitro colorimetric assays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990 Sep;31(9):1856-62.
158. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairi G, Russell EM, Park KG. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *Br J Surg.* 2001 Sep;88(9):1157-68.
159. Whistance RN, Forsythe RO, McNair AG, Brookes ST, Avery KN, Pullyblank AM, et al. A systematic review of outcome reporting in colorectal cancer surgery. *Colorectal Dis.* 2013 Oct;15(10):e548-60.
160. Rahbari NN, Weitz J, Hohenberger W, Heald RJ, Moran B, Ulrich A, et al. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of

the rectum: a proposal by the International Study Group of Rectal Cancer. *Surgery*. 2010 Mar;147(3):339-51.

161. Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg*. 2002 Apr;26(4):499-502.

162. Golub R, Golub RW, Cantu R, Jr., Stein HD. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. *J Am Coll Surg*. 1997 Apr;184(4):364-72.

163. Frasson M, Granero-Castro P, Flor-Lorente B, Ramos Rodríguez JL, Trallero M, Lucas E, Carreño O, García-Granero E, ANACO Study Group. Risk factors for anastomotic leak and postoperative outcome after elective right colectomy for cancer: results of a national, prospective, observational study including 1102 patients. *Colorectal Dis*. [Special issue: Abstracts of the 9th Scientific and Annual meeting of the European Society of Coloproctology.]. 2014;16(Supplement s3):10-20.

164. Chambers WM, Mortensen NJ. Postoperative leakage and abscess formation after colorectal surgery. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Oct;18(5):865-80.

165. Pommergaard HC, Gessler B, Burcharth J, Angenete E, Haglind E, Rosenberg J. Preoperative risk factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2014 Sep;16(9):662-71.

166. Steele SR, Park GE, Johnson EK, Martin MJ, Stojadinovic A, Maykel JA, et al. The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. *Dis Colon Rectum*. 2014 Mar;57(3):303-10.

167. Saha AK, Smith KJ, Sue-Ling H, Sagar PM, Burke D, Finan PJ. Prognostic factors for survival after curative resection of Dukes' B colonic cancer. *Colorectal Dis*. 2011 Dec;13(12):1390-4.

168. Mroczkowski P, Schmidt U, Sahm M, Gastinger I, Lippert H, Kube R. Prognostic factors assessed for 15,096 patients with colon cancer in stages I and II. *World J Surg*. 2012 Jul;36(7):1693-8.

169. Kang CY, Halabi WJ, Chaudhry OO, Nguyen V, Pigazzi A, Carmichael JC, et al. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *JAMA Surg*. 2013 Jan;148(1):65-71.

170. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg*. 1998 Mar;85(3):355-8.

171. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *J Am Coll Surg*. 2009 Feb;208(2):269-78.

172. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg.* 2006 Jul;76(7):579-85.
173. Pal SK, Hurria A. Impact of age, sex, and comorbidity on cancer therapy and disease progression. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 10;28(26):4086-93.
174. Cheung WY, Shi Q, O'Connell M, Cassidy J, Blanke CD, Kerr DJ, et al. The predictive and prognostic value of sex in early-stage colon cancer: a pooled analysis of 33,345 patients from the ACCENT database. *Clin Colorectal Cancer.* 2013 Sep;12(3):179-87.
175. van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenborg EM, Putter H, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol.* 2011 Jun;12(6):575-82.
176. Choi HK, Law WL, Ho JW. Leakage after resection and intraperitoneal anastomosis for colorectal malignancy: analysis of risk factors. *Dis Colon Rectum.* 2006 Nov;49(11):1719-25.
177. Fujita F, Torashima Y, Kuroki T, Eguchi S. The risk factors and predictive factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: reappraisal of the literature. *Surg Today.* 2014 Sep;44(9):1595-602.
178. Krarup PM, Jorgensen LN, Andreasen AH, Harling H. A nationwide study on anastomotic leakage after colonic cancer surgery. *Colorectal Dis.* 2013 Oct;14(10):e661-7.
179. Amato A, Pescatori M. Perioperative blood transfusions for the recurrence of colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev. [Meta-Analysis Review].* 2006(1):CD005033.
180. Harlaar JJ, Gosselink MP, Hop WC, Lange JF, Busch OR, Jeekel H. Blood transfusions and prognosis in colorectal cancer: long-term results of a randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2012 Nov;256(5):681-6; discussion 6-7.
181. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brunner N, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem.* 2008 Dec;54(12):e11-79.
182. Krarup PM, Nordholm-Carstensen A, Jorgensen LN, Harling H. Anastomotic leak increases distant recurrence and long-term mortality after curative resection for colonic cancer: a nationwide cohort study. *Ann Surg.* 2014 May;259(5):930-8.
183. Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2000 Mar;7(2):133-8.

184. Strey CW, Marquez-Pinilla RM, Markiewski MM, Siegmund B, Oppermann E, Lambris JD, et al. Early post-operative measurement of cytokine plasma levels combined with pre-operative bilirubin levels identify high-risk patients after liver resection. *Int J Mol Med*. 2011 Mar;27(3):447-54.
185. Leung KL, Lai PB, Ho RL, Meng WC, Yiu RY, Lee JF, et al. Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann Surg*. 2000 Apr;231(4):506-11.
186. Mokart D, Capo C, Blache JL, Delpero JR, Houvenaeghel G, Martin C, et al. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br J Surg*. 2002 Nov;89(11):1450-6.
187. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, et al. Increased plasma levels of IL-6 and IL-8 are associated with surgical site infection after pancreaticoduodenectomy. *Pancreas*. 2006 Mar;32(2):178-85.
188. Szczepanik AM, Scislo L, Scully T, Walewska E, Siedlar M, Kolodziejczyk P, et al. IL-6 serum levels predict postoperative morbidity in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2011 Aug;14(3):266-73.
189. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem*. 2001 Apr;47(4):617-23.
190. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*. 1998 Mar;77(6):956-64.
191. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 1999 Mar;5(3):487-91.
192. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62(5):343-50.
193. Lee SW, Gleason NR, Southall JC, Allendorf JD, Blanco I, Huang EH, et al. A serum-soluble factor(s) stimulates tumor growth following laparotomy in a murine model. *Surg Endosc*. 2000 May;14(5):490-4.
194. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2002 Feb 1;86(3):417-23.
195. Hormbrey E, Han C, Roberts A, McGrouther DA, Harris AL. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2003 Oct 1;9(12):4332-9.

196. Komen N, de Bruin RW, Kleinrensink GJ, Jeekel J, Lange JF. Anastomotic leakage, the search for a reliable biomarker. A review of the literature. *Colorectal Dis.* 2008 Feb;10(2):109-15; discussion 15-7.
197. Gill S, Sargent D. End points for adjuvant therapy trials: has the time come to accept disease-free survival as a surrogate end point for overall survival? *Oncologist.* 2006 Jun;11(6):624-9.
198. Pera M. [Anastomotic dehiscence and recurrence of colorectal cancer: an association that strengthens the prognostic value of the surgeon in the oncological outcome]. *Cir Esp.* 2011 Feb;89(2):69-71.
199. Takagawa R, Fujii S, Ohta M, Nagano Y, Kunisaki C, Yamagishi S, et al. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a predictive factor of recurrence after curative resection of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2008 Dec;15(12):3433-9.
200. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VL, O'Connell MJ, Thynne GS. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging, and prognosis of colorectal cancer. *Cancer.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1986 Aug 1;58(3):603-10.
201. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Mar 14;324(11):709-15.
202. Petersen SH, Harling H, Kirkeby LT, Wille-Jorgensen P, Mocellin S. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;3:CD004078.
203. Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW. The impact of postoperative complications on long-term outcomes following curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2007 Sep;14(9):2559-66.
204. Petersen S, Freitag M, Hellmich G, Ludwig K. Anastomotic leakage: impact on local recurrence and survival in surgery of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 1998;13(4):160-3.
205. Artinyan A, Orcutt ST, Anaya DA, Richardson P, Chen GJ, Berger DH. Infectious Postoperative Complications Decrease Long-term Survival in Patients Undergoing Curative Surgery for Colorectal Cancer: A Study of 12,075 Patients. *Ann Surg.* 2014 Sep 1.
206. Chang SC, Lin JK, Yang SH, Jiang JK, Chen WC, Lin TC. Long-term outcome of anastomosis leakage after curative resection for mid and low rectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2003 Nov-Dec;50(54):1898-902.
207. Eberhardt JM, Kiran RP, Lavery IC. The impact of anastomotic leak and intra-abdominal abscess on cancer-related outcomes after resection for colorectal cancer: a case control study. *Dis Colon Rectum.* 2009 Mar;52(3):380-6.

208. Fujita S, Teramoto T, Watanabe M, Kodaira S, Kitajima M. Anastomotic leakage after colorectal cancer surgery: a risk factor for recurrence and poor prognosis. *Jpn J Clin Oncol.* 1993 Oct;23(5):299-302.
209. Sánchez P, Pera M, Lorente L, Roges X, Iglesias M, Gallen M. Impact of postoperative peritoneal infection on disease-free survival in patients with stage II colon cancer. *Colorectal Dis.* [Special issue: Abstracts of the 9th Scientific and Annual meeting of the European Society of Coloproctology.]. 2014;16(Supplmt s3):10-20.
210. Khouri W, Lavery IC, Kiran RP. Impact of early reoperation after resection for colorectal cancer on long-term oncological outcomes. *Colorectal Dis.* 2012 Mar;14(3):e117-23.
211. Jorgren F, Johansson R, Damberg L, Lindmark G. Anastomotic leakage after surgery for rectal cancer: a risk factor for local recurrence, distant metastasis and reduced cancer-specific survival? *Colorectal Dis.* 2011 Mar;13(3):272-83.
212. Varty PP, Linehan IP, Boulos PB. Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. *Br J Surg.* 1994 Jun;81(6):915-8.
213. Richards CH, Platt JJ, Anderson JH, McKee RF, Horgan PG, McMillan DC. The impact of perioperative risk, tumor pathology and surgical complications on disease recurrence following potentially curative resection of colorectal cancer. *Ann Surg.* 2011 Jul;254(1):83-9.
214. Takeuchi H, Saikawa Y, Oyama T, Ozawa S, Suda K, Wada N, et al. Factors influencing the long-term survival in patients with esophageal cancer who underwent esophagectomy after chemoradiotherapy. *World J Surg.* 2010 Feb;34(2):277-84.
215. Farid SG, Aldouri A, Morris-Stiff G, Khan AZ, Toogood GJ, Lodge JP, et al. Correlation between postoperative infective complications and long-term outcomes after hepatic resection for colorectal liver metastasis. *Ann Surg.* 2010 Jan;251(1):91-100.
216. Laurent C, Sa Cunha A, Couderc P, Rullier E, Saric J. Influence of postoperative morbidity on long-term survival following liver resection for colorectal metastases. *Br J Surg.* 2003 Sep;90(9):1131-6.
217. Schiesser M, Chen JW, Maddern GJ, Padbury RT. Perioperative morbidity affects long-term survival in patients following liver resection for colorectal metastases. *J Gastrointest Surg.* 2008 Jun;12(6):1054-60.
218. Hsu YN, Liu CJ, Lin JK, Chen WS, Lin TC, Yang SH, et al. Liver abscess after liver metastasectomy is a poor prognostic factor in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2011 Oct;15(10):1798-806.
219. Nagasako Y, Satoh S, Isogaki J, Inaba K, Taniguchi K, Uyama I. Impact of anastomotic complications on outcome after laparoscopic gastrectomy for early gastric cancer. *Br J Surg.* 2012 Jun;99(6):849-54.

220. Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2003 Aug;83(4):222-6.
221. Groblewska M, Mroczko B, Sosnowska D, Szmitkowski M. Interleukin 6 and C-reactive protein in esophageal cancer. *Clin Chim Acta.* 2012 Oct 9;413(19-20):1583-90.
222. Kim DK, Oh SY, Kwon HC, Lee S, Kwon KA, Kim BG, et al. Clinical significances of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:155.
223. Wang Y, Yao X, Ge J, Hu F, Zhao Y. Can Vascular Endothelial Growth Factor and Microvessel Density Be Used as Prognostic Biomarkers for Colorectal Cancer? A Systematic Review and Meta-Analysis. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:102736.
224. Werther K, Sorensen S, Christensen IJ, Nielsen HJ. Circulating vascular endothelial growth factor six months after primary surgery as a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Acta Oncol.* [Comparative Study Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003;42(8):837-45.
225. Pascual M, Alonso S, Gil MJ, Courtier R, Grande L, Pera M. . Angiogenic response to surgery in patients after colon cancer resection and its correlation with oncological results on long term follow up. *Colorectal Dis.* [Special issue: Abstracts of the 7th Scientific and Annual Meeting of the European Society of Coloproctology.]. 2012;14(suplement s2):8-15.
226. Chen ZY, He WZ, Peng LX, Jia WH, Guo RP, Xia LP, et al. A prognostic classifier consisting of 17 circulating cytokines is a novel predictor of overall survival for metastatic colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2014 Jun 11.
227. Kantola T, Klintrup K, Vayrynen JP, Vornanen J, Bloigu R, Karhu T, et al. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 2012 Nov 6;107(10):1729-36.
228. Eustace D, Han X, Gooding R, Rowbottom A, Riches P, Heyderman E. Interleukin-6 (IL-6) functions as an autocrine growth factor in cervical carcinomas in vitro. *Gynecol Oncol.* 1993 Jul;50(1):15-9.
229. Ito R, Kitadai Y, Kyo E, Yokozaki H, Yasui W, Yamashita U, et al. Interleukin 1 alpha acts as an autocrine growth stimulator for human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.* 1993 Sep 1;53(17):4102-6.
230. Ito R, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Tahara E. Expression of interleukin-6 and its effect on the cell growth of gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res.* 1997 Oct;88(10):953-8.
231. Lahm H, Petral-Malec D, Yilmaz-Ceyhan A, Fischer JR, Lorenzoni M, Givel JC, et al. Growth stimulation of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin-1 and -6 and antagonistic effects of transforming growth factor beta 1. *Eur J Cancer.* 1992;28A(11):1894-9.

232. Okamoto M, Hattori K, Oyasu R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 1997 Jul 3;72(1):149-54.
233. Okamoto M, Lee C, Oyasu R. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 1997 Jan 1;57(1):141-6.
234. Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2000 Apr 3;151(1):31-8.
235. Sehgal PB, Tamm I. Interleukin-6 enhances motility of breast carcinoma cells. *Exs.* 1991;59:178-93.
236. Hsu CP, Chen YL, Huang CC, Chou CC, Liu CL, Hung CH, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits the progression in human colon carcinoma cells. *Eur J Clin Invest.* 2011 Mar;41(3):277-84.
237. Shantha Kumara HM, Cabot JC, Yan X, Herath SA, Luchtefeld M, Kalady MF, et al. Minimally invasive colon resection is associated with a persistent increase in plasma PIGF levels following cancer resection. *Surg Endosc.* 2011 Jul;25(7):2153-8.
238. Shantha Kumara HM, Gaita DJ, Miyagaki H, Yan X, Herath SA, Cekic V, et al. Minimally invasive colorectal resection is associated with significantly elevated levels of plasma matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) during the first month after surgery which may promote the growth of residual metastases. *Surg Endosc.* 2014 Jun 18.
239. Shantha Kumara HM, Tohme ST, Herath SA, Yan X, Senagore AJ, Nasar A, et al. Plasma soluble vascular adhesion molecule-1 levels are persistently elevated during the first month after colorectal cancer resection. *Surg Endosc.* 2012 Jun;26(6):1759-64.
240. Shantha Kumara HM, Tohme ST, Kim IY, Kim DG, Kalady MF, Luchtefeld M, et al. Minimally invasive colorectal resection is associated with a transient increase in plasma hepatocyte growth factor levels early after surgery for colon cancer. *Surg Innov.* 2011 Sep;18(3):254-8.
241. Shantha Kumara HM, Tohme ST, Yan X, Nasar A, Senagore AJ, Kalady MF, et al. Plasma levels of angiostatin and endostatin remain unchanged for the first 3 weeks after colorectal cancer surgery. *Surg Endosc.* 2011 Jun;25(6):1939-44.
242. Kumara HM, Feingold D, Kalady M, Dujovny N, Senagore A, Hyman N, et al. Colorectal resection is associated with persistent proangiogenic plasma protein changes: postoperative plasma stimulates in vitro endothelial cell growth, migration, and invasion. *Ann Surg.* 2009 Jun;249(6):973-7.
243. Shantha Kumara HM, Kirchoff D, Naffouje S, Grieco M, Herath SA, Dujovny N, et al. Plasma from the second and third weeks after open

- colorectal resection for cancer stimulates in vitro endothelial cell growth, migration, and invasion. *Surg Endosc.* 2012 Mar;26(3):790-5.
244. Middleton K, Jones J, Lwin Z, Coward JI. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014 Jan;89(1):129-39.
245. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012 Nov;38(7):904-10.
246. Podar K, Tai YT, Hideshima T, Vallet S, Richardson PG, Anderson KC. Emerging therapies for multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009 Mar;14(1):99-127.
247. Gacche RN, Meshram RJ. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. *Prog Biophys Mol Biol.* 2013 Nov;113(2):333-54.
248. Zhang H, Ye Y, Bai Z, Wang S. The COX-2 selective inhibitor-independent COX-2 effect on colon carcinoma cells is associated with the Delta1/Notch1 pathway. *Dig Dis Sci.* 2008 Aug;53(8):2195-203.
249. Garcia-Alfonso P, Grande E, Polo E, Afonso R, Reina JJ, Jorge M, et al. The role of antiangiogenic agents in the treatment of patients with advanced colorectal cancer according to K-RAS status. *Angiogenesis.* 2014 May 3.
250. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Colangelo LH, Lopa SH, et al. Initial safety report of NSABP C-08: A randomized phase III study of modified FOLFOX6 with or without bevacizumab for the adjuvant treatment of patients with stage II or III colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 10;27(20):3385-90.
251. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 1;29(1):11-6.
252. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Lopa SH, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 20;31(3):359-64.
253. Salvans S, Mayol X, Alonso S, Messeguer R, Pascual M, Mojal S, et al. Postoperative Peritoneal Infection Enhances Migration and Invasion Capacities of Tumor Cells In Vitro: An Insight Into the Association Between Anastomotic Leak and Recurrence After Surgery for Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 2014 Sep 19;260:939-44.
254. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):111-5.

255. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10.
256. Fan CW, Chen T, Shang YN, Gu YZ, Zhang SL, Lu R, et al. Cancer-initiating cells derived from human rectal adenocarcinoma tissues carry mesenchymal phenotypes and resist drug therapies. *Cell Death Dis*. 2013;4:e828.
257. Li Y, Wang L, Pappan L, Galliher-Beckley A, Shi J. IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Mol Cancer*. 2012;11:87.
258. Roxburgh CS, McMillan DC. The role of the *in situ* local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012 Aug;38(5):451-66.
259. Kang JC, Chen JS, Lee CH, Chang JJ, Shieh YS. Intratumoral macrophage counts correlate with tumor progression in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2010 Sep 1;102(3):242-8.
260. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*. 2014 Jan 21;110(2):469-78.
261. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014 Sep 25;513(7519):559-63.

