

**Universidad Autónoma de Barcelona
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía General y Digestiva
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA
PERITONEAL EN LA GASTRECTOMÍA POR CÁNCER: ABORDAJE
ABIERTO FRENTE ABORDAJE LAPAROSCÓPICO**

Trabajo de investigación presentado por **Ana M^a Otero Piñeiro**
Convocatoria Septiembre 2012

Director y Codirectores:

Dr. Jaume Fernández-Llamazares Rodríguez
Dr. José María Balibrea del Castillo
Dra. Elisenda Garsot Savall

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. Introducción..... | 5 |
| 1.1. Laparoscopia | |
| 1.1.1. Introducción..... | 5 |
| 1.1.2. Bases de la cirugía laparoscópica..... | 5 |
| 1.1.3. Primeras aplicaciones..... | 6 |
| 1.1.4. Aplicaciones en patología maligna..... | 10 |
| 1.1.5. Cáncer gástrico y laparoscopia..... | 11 |
| 1.2. Cáncer gástrico | |
| 1.2.1. Introducción..... | 14 |
| 1.2.2. Evolución histórica y diagnóstico..... | 17 |
| 1.2.3. Tratamiento..... | 18 |
| 1.2.3.1. Linfadenectomía..... | 23 |
| 1.2.3.2. Técnicas de reconstrucción..... | 26 |
| 1.2.4. Protocolo de seguimiento..... | 28 |
| 1.2.5. Tratamiento de las recidivas..... | 28 |
| 1.3. Respuesta inmunitaria..... | 29 |
| 2. Hipótesis..... | 37 |
| 2.1. Objetivos..... | 37 |
| 3. Material y métodos | |
| 3.1. Diseño del estudio..... | 39 |
| 3.1.1. Material utilizado en el grupo 1..... | 39 |
| 3.1.2. Material utilizado en el grupo 2..... | 39 |
| 3.2. Población diana. Criterios de inclusión y exclusión..... | 40 |
| 3.3. Protocolo de actuación, intervención y recogida de muestras | |
| 3.3.1. Estudio preoperatorio estándar..... | 42 |
| 3.3.2. Pauta de preparación preoperatoria..... | 42 |
| 3.3.3. Actividad preoperatoria inmediata..... | 42 |
| 3.3.4. Acto quirúrgico..... | 43 |
| 3.3.5. Recogida de muestras – Colección del tejido..... | 44 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.3.5.1. | Consideraciones generales | |
| 3.3.5.2. | Transporte del tejido | |
| 3.3.5.3. | Conservación del tejido en RNAlater® | |
| 3.3.5.4. | Congelación rápida del tejido | |
| 3.3.6. | Postoperatorio inmediato..... | 48 |
| 3.3.7. | Alta médica..... | 49 |
| 3.3.8. | Tratamiento adyuvante y neoadyuvante..... | 49 |
| 3.3.9. | Estudio anatomo-patológico..... | 49 |
| 3.4. | Procesamiento y análisis de muestras..... | 50 |
| 3.4.1. | Material empleado..... | 53 |
| 3.4.2. | Consideraciones generales..... | 54 |
| 3.4.2.1. | Preparación de las muestras | |
| 3.4.2.2. | Manejo de los chips de vidrio | |
| 3.4.2.3. | Incubación | |
| 3.4.3. | Protocolo arrays de proteínas. Detalles del mismo..... | 55 |
| 3.4.4. | Quantibody Q-Analyzer. Características generales..... | 60 |
| 4. | Resultados..... | 61 |
| 5. | Discusión..... | 65 |
| 6. | Conclusiones..... | 72 |
| 7. | Bibliografía..... | 73 |

1.INTRODUCCIÓN

1.1 .LAPAROSCOPIA

1.1.1.Introducción

La cirugía laparoscópica (CL) se introdujo por primera vez a finales de la década de los 80, con la finalidad de la evolución de la cirugía hacia métodos cada vez menos agresivos. Esta técnica aporta claras ventajas para el paciente como son el menor dolor postoperatorio y una mayor rapidez en la recuperación.

El factor más importante que ha facilitado el inicio de este tipo de cirugía ha sido la evolución de la tecnología necesaria para permitir este avance, así como la visión de futuro de los cirujanos pioneros que capitalizaron estos progresos tecnológicos. Esta técnica ha modificado, en tan sólo dos décadas, la práctica quirúrgica hasta el punto de superar las expectativas que tenían los cirujanos del pasado. No hay ninguna especialidad quirúrgica que no haya notado su influencia y todavía en la actualidad, debido a una evolución constante de la misma, quedan algunas controversias importantes que no están resueltas.

1.1.2.Bases de la cirugía laparoscópica

Desde hace años, la CL aporta resultados que confirman su importancia en el tratamiento de diversas patologías abdominales. La estrategia y las técnicas de disección no pueden compararse con las de la laparotomía, la percepción visual y la percepción táctil son totalmente diferentes; la disección y las suturas se realizan con instrumental específico introducido por orificios de trócares fijos. A pesar de la rápida evolución de la CL, esta técnica se basa en maniobras y principios operatorios simples y elementales (posición del paciente y de los cirujanos, disposición de los trócares, instrumentación, conocimiento de la

anatomía y realización de suturas intra y extracorporales).

Los beneficios que ha aportado la CL desde su introducción son los derivados de una herida abdominal de menor medida; menor dolor postoperatorio, mejor preservación de la función respiratoria, mejor recuperación postoperatoria con sedestación y deambulación precoz y como consecuencia una incorporación laboral más temprana. A largo plazo menos incidencia de hernias incisionales. La laparoscopia es un abordaje mínimamente invasivo, por lo que además de las ventajas nombradas, implica menor manipulación tisular y esto reduce la agresión asociada a la cirugía.

Desde su introducción la CL ha evolucionado en diferentes ámbitos. En primer lugar el tipo de abordaje: laparoscópico total con capnoperitoneo con presión positiva, abordaje sin gas, asistida con la mano o cirugía asistida por laparoscopia, SILS, cirugía a través de orificios naturales o NOTES, cirugía intraluminal y cirugía robótica. En segundo lugar la tecnología instrumental: sistemas de disección ultrasónicos de alta potencia, dispositivos de endograpado y sección lineal, sistema robótico da Vinci o sistema de visión en 3D. Aún así todavía hay cuestiones a resolver, como son garantizar la calidad del tratamiento quirúrgico laparoscópico, la formación de la próxima generación de cirujanos y la adecuada inversión de recursos.

1.1.3. Primeras aplicaciones

La exploración de la cavidad abdominal usando un equipo de endoscopia lo reporta por primera vez Kelling en 1901 quien examinó los órganos abdominales en perros insuflando aire en la cavidad abdominal, utilizando un cistoscopio; a este método se le llamó celoscopia¹. Unos años más tarde (1910), fue Jacobeus en Estocolmo el que lo utilizó en el hombre, inicialmente en la cavidad torácica introduciendo el término toracoscopia y posteriormente en el abdomen, llamándolo laparoscopia². Fue el mismo Jacobeus quien desarrolló uno de los pasos claves de la laparoscopia, la distensión de la cavidad abdominal para hacer posible su observación; él introducía un trócar y

una cánula, y hacía pasar aire ambiental a través de esta última, para luego insertar un cistoscopio.

Este tipo de abordaje inicialmente fue utilizado como técnica diagnóstica³. Dos décadas más tarde se empezó a utilizar esta vía de acceso con una finalidad terapéutica, siendo la ginecología el primer campo donde se aplicó. A finales de los 80 otras especialidades quirúrgicas empiezan a emplear esta técnica.

En cirugía general, la colecistectomía laparoscópica es la intervención de referencia y ha llegado a sustituir a la colecistectomía abierta. Aún así, todavía hay controversia en algunos aspectos: tratamiento intraoperatorio de cálculos en la vía biliar o el aumento de la morbilidad (3-4%) en casos de colecistitis aguda⁴.

En algunas intervenciones como la adrenalectomía y la esplenectomía, el beneficio que aporta la laparoscopia en términos de morbilidad y aceleración de la recuperación es indiscutible y plenamente aceptado; siendo únicamente justificado un abordaje abierto en casos concretos de grandes esplenomegalias o tumoraciones adrenales de tamaño considerable.

La cirugía del reflujo gastro-esofágico y la miotomía esofágica en la acalasia, se incluyen en la misma categoría de utilidad, obteniendo buenos resultados en series largas. En lo referente a la cirugía bariátrica la CL ha tenido un papel muy importante, dado que en los últimos años ha aumentado la pandemia mundial de sobrepeso y obesidad mórbida.

Hoy en día la mayoría de procedimientos empleados en cirugía bariátrica se realizan mediante esta vía. Ha permitido además la introducción de nuevas intervenciones quirúrgicas como la colocación de bandas, que tienen la indudable ventaja de la posibilidad de reversión, sin modificar las características anatómicas y fisiológicas del tracto gastrointestinal superior. El bypass gástrico, considerado por muchos como el “gold-standard” de la cirugía bariátrica^{5 6} se realizó por primera vez por vía laparoscópica en el año 1994⁷ y

tiene la ventaja de una movilización más precoz, con menor dolor en el postoperatorio inmediato, menor estancia hospitalaria y menor tasa de hernias incisionales que en la vía abierta. No obstante, es una técnica difícil que requiere de un número considerable de intervenciones para conseguir un nivel de destreza adecuado^{8 9}. Las ventajas de esta técnica se han confirmado en diversos estudios randomizados publicados en los últimos años^{10 11}, aunque actualmente está cobrando importancia el Sleeve gástrico, técnica realizada también por vía laparoscópica cuyos resultados son comparables e incluso superan a los del bypass gástrico¹². El primer Sleeve gástrico laparoscópico se realizó en el Hospital Mount Sinaí de Nueva York en el año 1999, con los beneficios clínicos y fisiológicos que conlleva el realizar el procedimiento por vía laparoscópica descritos previamente. El Sleeve gástrico es hoy por hoy el más nuevo y prometedor de los procedimientos para el manejo y control de la obesidad. Es un procedimiento seguro y efectivo para tratar la obesidad así como las enfermedades relacionadas con ella, tales como la diabetes mellitus y la hipertensión^{13 14 15}. Aunque tiene relativamente poco tiempo, los estudios a corto y medio plazo que se han realizado han mostrado resultados excelentes, obteniendo una pérdida de peso mayor que con la banda gástrica y sólo ligeramente menor que con el bypass gástrico, pero con mucho menor índice de complicaciones y consecuencias a medio y largo plazo que éste último.

Durante muchos años los cirujanos coloproctólogos han sido reticentes a la introducción de la CL en su campo, pero la aparición de ensayos clínicos con asignación aleatoria ha hecho que se reconozcan los efectos beneficiosos que tiene la CL en la evolución de los pacientes¹⁶, no sólo en términos de dolor postoperatorio, menor estancia hospitalaria e inicio precoz de la actividad habitual sino también en el caso del colon, un inicio de la función intestinal y de la tolerancia a la dieta más precoz¹⁷. En patología benigna la colectomía laparoscópica, en casos de enfermedad diverticular, ya demuestra tasas menores de morbilidad o como mínimo similares^{18 19 20} y se pueden aplicar los mismos principios quirúrgicos que en la cirugía abierta (CA)²¹.

En cuanto a la apendicectomía, realizada por vía laparoscópica por primera vez hace 31 años²², sigue siendo hoy en día objeto de debate^{23 24}. Las indicaciones principalmente son en caso de obesidad importante, en los que la CL garantiza un menor dolor postoperatorio y recuperación más precoz y en los casos en los que sea necesario realizar un diagnóstico diferencial con patología ginecológica.

Durante los últimos años se ha tendido a tratar las complicaciones de las pancreatitis graves mediante abordajes endoscópicos, radiología intervencionista y laparoscópico. La formación de pseudoquistes es frecuente y en algunas ocasiones la vía laparoscópica ha sido útil para el drenaje de los mismos al estómago o yeyuno con una morbilidad postoperatoria baja y con unos resultados eficaces²⁵. También se ha empleado esta vía para la realización de necrosectomías, observando la tendencia a un aumentando de la supervivencia en estos pacientes graves.

Dentro de la cirugía benigna del páncreas también se ha encontrado la utilidad en la detección de insulinomas que la ecografía intraoperatoria permite localizar²⁶. Del mismo modo, el tratamiento de estas tumoraciones benignas (tumores neuroendocrinos, neoplasias quísticas) mediante la enucleación o la pancreatectomía distal con preservación esplénica es una técnica segura, aún presentando en ocasiones fistulas pancreáticas que suelen ser de bajo débito y se suelen resolver espontáneamente²⁷.

Las resecciones hepáticas laparoscópicas también se han realizado con resultados en general favorables, especialmente en relación con resecciones de segmentos múltiples y lobectomía izquierda. En patología benigna se han realizado desde fenestraciones o cistopericistectomías en casos de quistes hepáticos, hasta resecciones segmentarias o hepatectomías en casos de adenomas, hiperplasia nodular focal, quistes hidatídicos o hemangiomas²⁸. Los efectos beneficiosos observados son principalmente la reducción de las pérdidas sanguíneas²⁹, la disminución de las dificultades en el postoperatorio en los pacientes con hepatopatía³⁰ y la reducción de la estancia hospitalaria³¹
^{32 33}.

1.1.4. Aplicaciones en patología maligna

Las primeras publicaciones sobre colectomías asistidas por laparoscopia en cáncer colorrectal sugieren que el menor trauma que ofrece la CL disminuye las complicaciones postoperatorias e implica una recuperación precoz del paciente³⁴. No obstante, el desarrollo de metástasis en los puertos de entrada ha sido motivo de controversia en la utilización de esta vía de abordaje^{35 36}, pero existen publicaciones que demuestran que el riesgo es bajo (0% a 1,1-3%)³⁷.

Mientras que en la cirugía de otros órganos sólidos el abordaje laparoscópico se ha consolidado de forma clara, no ha sucedido lo mismo en el hígado, posiblemente porque es técnicamente difícil y existe un potencial de riesgo de hemorragia masiva o embolia gaseosa³⁸. A pesar de ello, se inició esta vía en el año 1991³⁹ con una evolución lenta. La resección laparoscópica de metástasis hepáticas en el carcinoma colorrectal ha sido motivo de controversia por la dificultad para obtener unos márgenes correctos, por la posibilidad de diseminación tumoral con el neumoperitoneo y por el riesgo de embolia gaseosa a través de la superficie cruenta del hígado o a través de una vena suprahepática³⁵. En todo caso la cirugía de las metástasis hepáticas del carcinoma colorrectal es el único tratamiento con finalidad curativa y para plantear la vía laparoscópica se ha de asegurar la resección completa con márgenes adecuados (dificultado por la falta de tacto y la necesidad de realizar una ecografía intraoperatoria en los segmentos posteriores). En cuanto a la resección laparoscópica de metástasis de carcinoma no colorrectal no está completamente aceptada la indicación porque la enfermedad extrahepática suele estar presente. En el caso del hepatocarcinoma, la CL tiene sus indicaciones en casos de tumores pequeños y periféricos, disminuyendo la producción de ascitis postoperatoria que provoca la sección de la circulación colateral en el caso de la CA.

Desde el año 1994 con el inicio de la CL del páncreas⁴⁰ se empiezan a hacer las primeras resecciones de tumores (neuroendocrinos, neoplasias quísticas, carcinomas ductales y acinares, tumores sólidos papilares). La

mayoría son pancreatectomías distales con o sin preservación esplénica. La duodenopancreatectomía por laparoscopia está considerada una técnica de efecto beneficioso incierto dado que es una cirugía compleja que requiere de cirujanos expertos no sólo en CL sino en cirujanos del páncreas. Su utilidad de momento, es cuestionable, dado que el objetivo de este abordaje no es evitar cicatrices sino disminuir complicaciones, presentando en los estudios publicados una tasa de complicación del 30%⁴¹.

1.1.5.Cáncer gástrico y laparoscopia

La aplicación de las técnicas mínimamente invasivas en la cirugía gástrica data de la década de los 90, un inicio tardío y lento en comparación con otros campos. La primera gastrectomía laparoscópica con reconstrucción Billroth II se realizó en el año 1992 por Goh et al en patología benigna⁴² y fue Kitano quien el mismo año realizaba la primera gastrectomía con reconstrucción tipo Billroth I para la resección de una neoplasia gástrica⁴³.

Una de las primeras utilidades de la CL en el cáncer gástrico fue su empleo para la estadificación de esta neoplasia^{44 45}. Posteriormente se fue introduciendo esta vía de acceso para su tratamiento, inicialmente para la realización de resecciones limitadas en patología benigna hasta llegar a tratamiento quirúrgico completo hoy en día.

También se empezaron a tratar tumores del estroma gastrointestinal (GIST) que ofrecen la ventaja de no requerir linfadenectomía aunque sí es necesario la obtención de márgenes suficientes. Se comprobó en este caso que esta vía ofrecía los mismos resultados que la cirugía abierta en cuanto a tiempo quirúrgico, pérdidas sanguíneas, tasa de complicaciones postoperatorias y recurrencia a corto plazo, pero disminuía de manera significativa la estancia hospitalaria⁴⁶. A finales de la década de los 90 y principios de 2000 se empezaron a publicar las primeras experiencias en gastrectomías laparoscópicas por cáncer.

La introducción de una nueva técnica como es la laparoscópica en la cirugía del cáncer gástrico ha hecho plantearse diferentes cuestiones. Para iniciar cualquier procedimiento nuevo hace falta que aporte alguna ventaja respecto a los ya existentes (más seguro, más fácil, mejores resultados estéticos, estancia hospitalaria menor, más barato, menos anestesia general....). Con la introducción de la CL en la cirugía neoplásica gástrica el objetivo inicial era obtener las mismas ventajas que se habían demostrado en otros ámbitos. Los motivos de controversia que se han planteado desde sus inicios no son diferentes de los planteados en el cáncer de colon, que es uno de los campos donde la cirugía laparoscópica ha avanzado más. La primera cuestión es conseguir una técnica quirúrgica que sea lo más similar posible a la realizada por vía abierta, tanto en términos oncológicos (márgenes de resección, linfadenectomía, diseminación tumoral...) como en términos de seguridad quirúrgica (tiempos quirúrgicos no excesivamente largos, pérdidas sanguíneas similares, seguridad en las anastomosis...) con tal de ofrecer una técnica que no sea perjudicial para el paciente. En segundo lugar, el objetivo es igualar o mejorar otros factores que inicialmente pueden ser secundarios como: la estancia hospitalaria, el inicio del tránsito intestinal y de la ingesta, el tiempo de reincorporación a la vida laboral, el número de hernias incisionales e incluso los costes de la técnica.

Por todos estos motivos las primeras incursiones de la laparoscopia en este ámbito, a finales del siglo pasado y a principios del presente, se realizaron en cáncer gástrico precoz⁴⁷. Principalmente fueron resecciones subtotales con reconstrucciones sencillas y asistidas manualmente. Estas primeras gastrectomías se empiezan a hacer en países orientales donde la detección de cáncer gástrico en estadios iniciales es frecuente y se ha incrementado en los últimos años debido al rápido avance en técnicas diagnósticas y a la mejora en técnicas de screening. Para el cáncer gástrico precoz se han empleado diferentes técnicas laparoscópicas sencillas^{48 49} y progresivamente se ha ido incrementando la complejidad realizando gastrectomías subtotales/totales con linfadenectomía asociada.

A partir del año 2003 surgen los primeros estudios aleatorizados en países orientales que comparan las dos vías de acceso en cáncer gástrico precoz^{50 51} y concluyen que la laparoscopia ofrece una menor afectación de la función pulmonar, menor dolor postoperatorio y una recuperación más rápida manteniendo los principios oncológicos que ofrece la cirugía abierta. En Febrero de 2005 aparece el primer estudio europeo randomizado: pacientes con neoplasias en todos los estadios tumorales a los que aleatoriamente se les practica una gastrectomía subtotal con linfadenectomía D2 por vía laparoscópica o abierta. No se detectan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de morbimortalidad, número de ganglios extirpados y supervivencia a los 5 años.

1.2 .EL CÁNCER GÁSTRICO

1.2.1.Introducción

Las neoplasias del tracto gastrointestinal superior (esófago, cardias y estómago) constituyen , actualmente, un problema de salud importante. La prevalencia de cáncer gástrico en España es de 15-24 casos 10.000 habitantes/año, similar a la de Estados Unidos (21,26 casos por 10.000 habitantes/año) y ligeramente superior a la media de la Unión Europea.

Existen diferencias en la incidencia del cáncer de estómago en cuanto a la distribución geográfica, ya que podemos hablar de zonas de elevada incidencia como Asia (principalmente Japón), Oeste de América del Sur y Europa del Este Oriental (70-80 casos por 10.000 habitantes/año). Afecta más frecuentemente a hombres (relación 2:1) y se suelen diagnosticar a partir de los 50-60 años.

En las últimas décadas se está observando una disminución en la incidencia del cáncer gástrico a expensas del cáncer gástrico distal, ya que el número de casos del tercio proximal está en aumento. Este descenso parece relacionarse con la mejora en los hábitos alimentarios y con la conservación de los alimentos en refrigeradores (alimentos salados que favorecen la aparición de cáncer gástrico frente al consumo de frutas y verduras que lo previenen). La infección por *Helicobacter pylori* se asocia a diferentes situaciones de inflamación crónica del estómago, concretamente con la gastritis crónica atrófica, una lesión inflamatoria precursora del adenocarcinoma gástrico, hecho que ha llevado a establecer la hipótesis de que este microorganismo por sí mismo es una causa de carcinoma gástrico^{52 53 54}. Por otro lado la incidencia familiar de cáncer gástrico es relativamente frecuente como lo demuestra el hecho de que se ha registrado una historia familiar en hasta el 19% de los casos⁵⁵. No obstante, no está claro qué papel tienen las alteraciones genéticas heredadas y cuáles son los factores ambientales comunes.

La mortalidad de esta patología es elevada. La tasa de mortalidad por cáncer gástrico en España muestra una tendencia descendente similar a la de resto de países de nuestro entorno. Es la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres después de las localizaciones primarias de pulmón, colorrectal y próstata; y en mujeres la tercera después del carcinoma de mama y el colorrectal. El interés sobre esta patología continua siendo elevado, ya que muchos de los pacientes con cáncer gástrico en países desarrollados mueren por recidiva o progresión de la enfermedad.

Desde el punto de vista epidemiológico se consideran dos tipos de Adenocarcinoma gástrico (Clasificación de Lauren):

-Tipo intestinal: de predominio en las poblaciones de elevado riesgo. La disminución de la frecuencia del carcinoma gástrico comentada es a expensas de este tipo (Fig. 1). Con él se asocian los factores ambientales conocidos, las lesiones precursoras (gastritis superficial, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia....). Es más frecuente en edades avanzadas y su pronóstico es relativamente mejor.

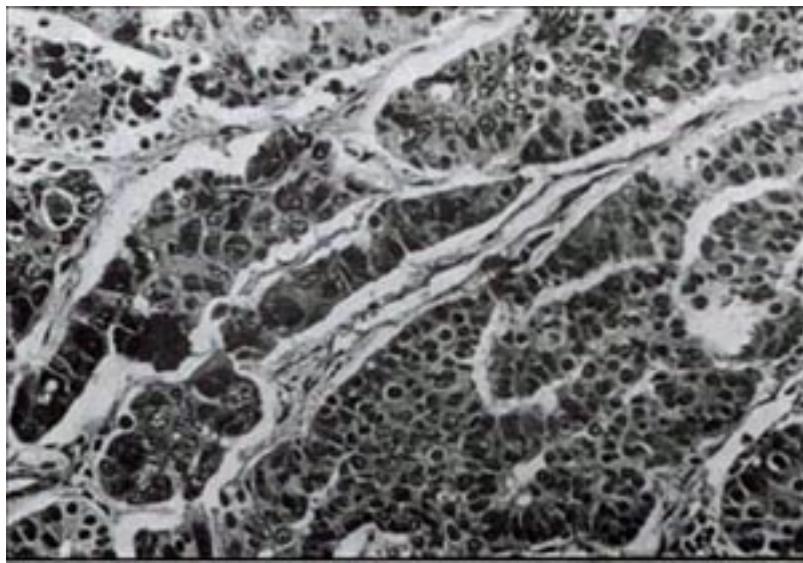


Figura 1:
Adenocarcinoma tipo
intestinal. Variedad
tubular pobemente
diferenciado.
http://sisbib.unmsm.edu.pe/brevistas/gastro/vol_15n3/tip_histologicos_can_gast.htm

-Tipo difuso: su frecuencia es similar en todos los países. Predomina en mujeres y en personas más jóvenes, con peor pronóstico y, aunque no procede de lesiones precursoras, parece tener cierta susceptibilidad genética o familiar, con fuerte relación con el grupo sanguíneo A (Fig. 2).

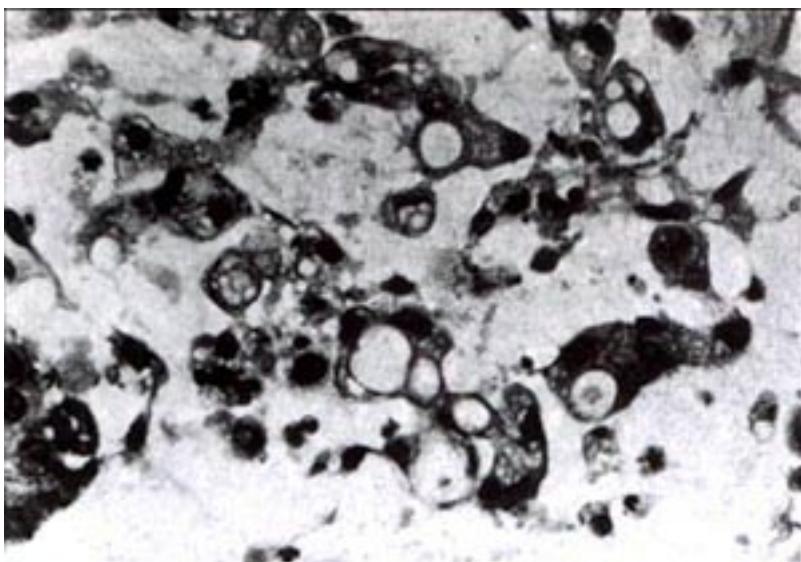


Figura 2:

Adenocarcinoma tipo difuso. Células en anillo de sello.

http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/gastro/vol_15n3/tip_histologicos_can_gast.htm

Solamente un 40% de los pacientes diagnosticados de cáncer gástrico debutarán con enfermedad resecable. A pesar de ello, el 60% de los pacientes que han sido sometidos a una cirugía completa recidivarán, sobre todo a nivel loco-regional (70%), peritoneal (25-50%) y hepático (30%).

El 60% de los pacientes operados de cáncer gástrico desarrollarán metástasis, con una supervivencia a los 5 años inferior al 30% (24 meses de media). De forma inicial un 30% de los pacientes debutarán con enfermedad localmente avanzada irresecable y el 30% restante con enfermedad metastásica. El pronóstico de los pacientes con enfermedad localmente avanzada es de 12-15 meses, y en los metastásicos tratados con quimioterapia de 7-10 meses.

La sintomatología del cáncer gástrico es inespecífica. El carcinoma gástrico superficial, potencialmente curable con cirugía, típicamente no produce síntomas, por eso suelen diagnosticarse en estadios avanzados o metastásicos.

1.2.2.Evolución histórica - Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer gástrico incluye la realización de una serie de pruebas de gabinete, laboratorio e imagen (fibrogastroskopía, biopsia, ecoendoscopia, TAC toraco-abdominal, analítica general, tránsito esófago-gastro-duodenal). Además es necesario proceder a un estudio nutricional del paciente antes de iniciar cualquier opción terapéutica.

En patología gástrica, los conceptos fisiopatológicos, diagnósticos, tratamientos médicos y procedimientos quirúrgicos se han desarrollado prácticamente en el último siglo.

Las primeras publicaciones sobre el cáncer gástrico son de finales de la década de los 40, en los que se empieza a investigar sobre su fisiopatología y diagnóstico y una década más tarde aparecen los primeros textos sobre el tratamiento de este tipo de neoplasia^{56 57}. Hace unos 30-35 años el diagnóstico del cáncer gástrico hace un salto considerable gracias al establecimiento de una metodología diagnóstica que incluye: la radiología con doble contraste, la endoscopia y la biopsia endoscópica.

A partir de los años 80 el número de casos en estadios iniciales (“early gastric cancer”) tratados en las instituciones japonesas que disponen de un equipo específico de gastroenterología llega a ser de más de un 50%⁵⁸.

Una cuidadosa estadificación preoperatoria no es sólo importante para poder predecir el pronóstico sino esencial para establecer un tratamiento individualizado del cáncer gástrico. Inicialmente la estadificación se basaba en la clínica, los resultados analíticos y las imágenes radiológicas obtenidas con la ecografía, la TC y la RMN. A partir de los años 80, con la introducción de la ecografía endoscópica, la precisión para determinar la penetración en profundidad del cáncer y la afectación de los ganglios adyacentes llega a ser de hasta un 78-92% y 63-78% respectivamente. Así mismo, con la introducción de la laparoscopia en la década de los 90 el estudio de estos pacientes llega a ser muy minucioso.

Hoy en día, tal y como hemos señalado previamente, a pesar de los avances tecnológicos, la supervivencia global a los 5 años es baja, destacando que aproximadamente un 60% de los pacientes se diagnostican en estadios III o IV y que el 80% de estos pacientes desarrollará una recurrencia. El diagnóstico del cáncer gástrico en estadios iniciales se podría conseguir mediante la aplicación de programas de “screening” difícilmente aplicables, dado que su incidencia no es lo suficientemente elevada, sobre todo en los países occidentales. Los esfuerzos, se han centrado en la mejora del pronóstico de estos pacientes basándose en la radicalidad quirúrgica y la reducción de la recurrencia, realizando linfadenectomías extensas y tratamientos complementarios⁵⁹.

1.2.3.Tratamiento

En lo referente al tratamiento, es necesario hacer referencia a varios puntos, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y cirugía. A pesar de que en los últimos años la tasa de resecciones curativas ha aumentado, así como la supervivencia, hay un elevado porcentaje, entre un 30 y un 60%, de recidivas locorregionales, fundamentalmente localizadas en la anastomosis, el lecho gástrico y el peritoneo. Además, la supervivencia en los tumores avanzados (estadios III y IV), que representan más del 60% de los casos, no ha mejorado a pesar de resecciones más radicales. Por estos motivos, se han intentado mejorar los resultados añadiendo a la cirugía diferentes tratamientos, neoadyuvantes o adyuvantes⁶⁰.

-Quimioterapia (QT): el cáncer gástrico es el adenocarcinoma del tubo digestivo que mejores índices de respuesta objetivos (40-50%) presenta ante la quimioterapia. No existe un esquema de referencia de *quimioterapia adyuvante* en cáncer gástrico, porque, a pesar de los múltiples ensayos clínicos realizados en las últimas cuatro décadas, no hay estudios consistentes que denoten un beneficio claro en la supervivencia respecto a la cirugía. Se han publicado 5 metanálisis^{61 62 63 64 65} que han demostrado que la quimioterapia adyuvante aporta un pequeño beneficio en la supervivencia (3-5%). Independientemente

de estos resultados, dado que no existe un estudio en población occidental bien diseñado con suficiente poder estadístico que haya demostrado un beneficio en la supervivencia, no se ha de considerar la quimioterapia adyuvante como un tratamiento estándar.

Como alternativa al tratamiento adyuvante, dentro de la enfermedad potencialmente resecable se han estudiado otras estrategias de tratamiento sistémico previo a la cirugía, como es la *quimio-radioterapia preoperatoria*, o bien, la *quimioterapia perioperatoria*. Las ventajas esperadas del tratamiento neoadyuvante con quimio-radioterapia o quimioterapia sola con la reducción del volumen tumoral, para favorecer una cirugía radical, así como el control de la enfermedad a distancia reduciendo el riesgo de metástasis. Por otro lado, el paciente tolera mejor el tratamiento neoadyuvante condicionando un mayor control sintomático tumoral y llegando en mejores condiciones a la cirugía. Después de la publicación en 2006 del estudio fase III inglés MAGIC⁶⁶, la quimioterapia perioperatoria ha sido un tratamiento importante dentro de la enfermedad gástrica resecable. El grupo francés ACCORD en el estudio FFCD 9703⁶⁷ también publicó las ventajas de la quimioterapia perioperatoria con 5-FU y cisplatino, contra la cirugía sola, respecto a la supervivencia libre de progresión y global en enfermedad gástrica resecable. Por tanto, podemos valorar un tratamiento neoadyuvante con quimioterapia en pacientes con tumores localmente avanzados (cT3-T4 o N+).

En el caso de pacientes con *tumores gástricos diseminados*, con poca comorbilidad e índice de Karnofsky superior a 60, se recomienda tratamiento únicamente quimioterápico. Hay estudios en fase III^{68 69 70 71} que demuestran el beneficio de la quimioterapia vs. el mejor tratamiento de soporte, aportando un beneficio en la supervivencia (7-10 meses vs 3-4 meses) y en calidad de vida.

-Radioterapia (RDT): aunque el adenocarcinoma gástrico es una neoplasia radiosensible, el factor limitante de este tratamiento es la baja tolerancia a la radiación del estómago y los órganos vecinos (intestino delgado, riñones, etc.). Debido a esta baja tolerancia, actualmente se está investigando el empleo de nuevas pautas de irradiación con la asociación de agentes

radiosensibilizantes, radioprotectores o hipertermia. La *radioterapia como tratamiento exclusivo* del cáncer gástrico tiene por tanto un papel muy limitado y se reduce a la paliación de síntomas en tumores irresecables. La RDT asociada a QT se puede administrar de forma preoperatoria o complementaria a la cirugía. Sólo se ha publicado un trabajo aleatorizado con RDT preoperatoria no asociada a QT. En éste se observó una mejoría significativa de la supervivencia (30% vs 20%, p 0.0094) y de la tasa de resección (89.5% vs 79%) en el grupo de pacientes que habían recibido RDT. A pesar de ello, no se considera un estándar por no existir trabajos que confirmen estos datos en nuestro medio. La QT-RDT concomitante con intención preoperatoria tiene como ventaja que el volumen a tratar con RDT se define de una forma más precisa (tumor visible) sin retraso del tratamiento en espera de la recuperación postquirúrgica y que el potencial *downstaging* facilitaría la radicalidad de la cirugía. En lo referente a la *RDT postoperatoria* exclusiva no existe evidencia de los beneficios en términos de supervivencia, aunque mejora de forma discreta el control local.

-Inmunoterapia: Se ha comprobado en pacientes con cáncer gástrico que la depresión inmunitaria es proporcional a la extensión del tumor. Por ello, el papel de los inmunoestimulantes en el tratamiento del cáncer gástrico ha sido analizado en numerosos estudios. Sin embargo, los resultados obtenidos, excepto Japón, no han confirmado la utilidad de estos agentes.

-Cirugía: A pesar de los avances realizados en los tratamientos quimioterápicos, el principal tratamiento curativo del cáncer gástrico sigue siendo la cirugía, aunque la cirugía R0 (márgenes negativos, sin enfermedad residual) asociada a una mayor supervivencia, se consigue sólo en menos de la mitad de los pacientes. Los resultados en términos de supervivencia son insatisfactorios, excepto en el caso de carcinomas en estadios iniciales. Hay que tener en cuenta que la proporción de cánceres en estadios iniciales en las instituciones japonesas es de hasta un 50%, mucho más elevada que en los países occidentales que sólo es del 5-15%; pero si comparamos estadio por estadio, los cánceres gástricos de ambos orígenes se comportan igual si se tratan con una cirugía radical. Incluso, desde el punto de vista de biología

molecular no se han detectado diferencias en cuanto a expresión de oncogenes y genes supresores tumorales entre cánceres gástricos procedentes de países orientales respecto a occidentales⁷². La supervivencia a los 5 años del cáncer gástrico tratado con cirugía convencional es del 90%, no obstante, con la disminución de la calidad de vida que comporta la resección gástrica, se ha optado en casos seleccionados, por técnicas menos agresivas. En estadios avanzados la supervivencia a los 5 años es del 3-13%. Para reducir la recurrencia y mejorar la tasa de supervivencia en estos últimos casos se han propuesto técnicas quirúrgicas más radicales.

El tipo de técnica quirúrgica se decidirá en función varios factores. Las cuestiones que nos tenemos que plantear son principalmente tres; tipo de gastrectomía adecuada, necesidad de exéresis de otros órganos y linfadenectomía sí o no y cuál es la más adecuada.

El tipo histológico, el aspecto macroscópico, la localización del tumor, la calidad de vida del paciente, la edad y la supervivencia esperada determinarán la extensión de la gastrectomía a realizar.

En las formas histológicas de cáncer diferenciado (tipo intestinal), la resección del tumor debe hacerse con un margen de seguridad de 5 cm. Este margen permite considerar una gastrectomía parcial en los tumores de tamaño reducido. En cambio en las formas histológicas indiferenciadas (tipo difuso), se recomienda respetar un margen mayor (8 cm), lo que se traduce en una gastrectomía total en la mayoría de los casos.

En las formas de cáncer gástrico superficial, sin invasión de la submucosa (cáncer gástrico precoz) se recomienda respetar un margen de seguridad de 2 cm, lo cual permite plantear resecciones gástricas parciales que no empeoran la supervivencia, pero sí mejoran la tasa de morbilidad y la calidad de vida de los pacientes.

La resección mucosa endoscópica en pacientes con Cáncer gástrico precoz consigue una supervivencia igual a la resección gástrica convencional

(90%) en casos seleccionados⁷³. Las indicaciones de esta técnica son: adenocarcinomas bien/moderadamente diferenciados, menores de 2 cm y sin afectación linfática.

La gastrectomía total elimina la posibilidad de recurrencia a nivel de la boca anastomótica y en determinados grupos ganglionares que no se extirpan en una gastrectomía subtotal. En los tumores de tercio proximal y medio la gastrectomía total es el procedimiento de elección. En tumores antrales, los resultados de series retrospectivas concluyen que no existen diferencias significativas en cuanto a supervivencia entre los pacientes tratados con una gastrectomía total y subtotal^{74 75 76}. Para los tumores antrales, con la ventaja de la mejor calidad de vida y menor morbilidad, la gastrectomía subtotal es el procedimiento de elección en centros japoneses, mientras que en países occidentales como Alemania la gastrectomía total es la técnica elegida⁷⁷.

En caso de una invasión de un órgano adyacente (páncreas, colon transverso, bazo, hígado, mesocolon) se puede valorar la resección en el mismo acto quirúrgico, del órgano afectado, junto con la pieza de la gastrectomía. Este tipo de resección mayor, sólo está justificada si no existen metástasis asociadas.

Por otro lado, en la cirugía del cáncer gástrico, en algunas ocasiones la esplenectomía se ha realizado con un objetivo de mejorar la linfadenectomía de la arteria esplénica y del hilio esplénico, en cambio, el pronóstico es controvertido en pacientes con esplenectomía asociada. La incidencia de metástasis en el hilio esplénico es de un 10% en el cáncer gástrico proximal⁷⁸. Dada la anatomía de los ganglios linfáticos en el territorio gástrico, algunos autores postulan que es necesaria la resección esplénica en el tratamiento del cáncer gástrico proximal, mientras que otros afirman que la esplenectomía no sólo no aumenta la supervivencia, sino que además aumenta la morbilidad^{79 80 81 82 83 84}.

La linfadenectomía de la arteria esplénica incluye la disección ganglionar del borde superior del páncreas y en algunos casos se ha asociado una

resección de la cola del páncreas, para mejorar la radicalidad de esta disección, aunque esto se ha asociado a una elevada morbilidad (fístulas pancreáticas, abscesos subfrénicos, diabetes postoperatoria). Aún así se ha demostrado, que los linfáticos no desembocan directamente en el parénquima pancreático y que el bazo, la arteria esplénica y el tejido conectivo que rodea los ganglios se pueden extirpar sin necesidad de resecar el páncreas ni la vena esplénica y así mejorar la tasa de morbilidad postoperatoria⁸⁵.

1.2.3.1.Linfadenectomía

La extensión de la linfadenectomía es el punto más polémico en el tratamiento del cáncer gástrico. Se estima que en Occidente más de la mitad de los pacientes tienen metástasis linfáticas en el momento del diagnóstico. Como la existencia de metástasis linfáticas puede ser difícil de valorar por el cirujano, ya que ganglios aumentados de tamaño pueden ser inflamatorios y, a la inversa, puede existir infiltración ganglionar cuando en el acto operatorio no se observaron adenopatías aumentadas de tamaño, se acepta que cualquier técnica de cirugía radical debe acompañarse siempre de la extirpación del territorio linfático “potencialmente” afecto. La *Japanese Research Society for Gastric Cancer* (JRSGC) ha propuesto cinco tipos de linfadenectomía designadas como D (tabla 1-2) que los autores occidentales denominan como R creando confusión con el tipo de resección. Por ello se reserva el término R para describir el tipo de resección (R0: resección completa sin restos tumorales; R1: resección dejando restos microscópicos; R2: resección dejando restos macroscópicos) empleando la terminología japonesa para designar el tipo de linfadenectomía.

Tabla 1: Clasificación según linfadenectomía y resección. *Guía esofagogástrica AEC.*

| TERMINOLOGÍA EN LA CIRUGÍA DEL CÁNCER GÁSTRICO | |
|---|---|
| Clasificación de las resecciones gástricas basada en la linfadenectomía (Japanese Research Society for Gastric Cancer en 1993) | |
| - D0 | Resección gástrica con extirpación incompleta del Nivel I. |
| - D1 | Resección gástrica con extirpación completa del Nivel I. |
| - D2 | Resección gástrica con extirpación completa de los Niveles I y II. |
| - D3 | Resección gástrica con extirpación completa de los Niveles I, II y III. |
| - D4 | Resección gástrica con extirpación completa de los Niveles I, II, III y IV. |
| Clasificación según el tipo de resección (Clasificación TNM) | |
| - RO | Resección completa del tumor. |
| - R1 | Resección del tumor dejando restos microscópicos. |
| - R2 | Resección del tumor dejando restos macroscópicos. |

Tabla 2: Niveles Linfadenectomía. *Guía esofagogástrica AEC.*

| GRUPOS GANGLIONARES GÁSTRICOS SEPARADOS POR NIVELES (JRSGC) | |
|---|--|
| 1. Cardiales derechos | |
| 2. Cardiales izquierdos | |
| 3. Curvatura menor | |
| 4. Curvatura mayor | |
| 5. Suprapilóricos | |
| 6. Infrapilóricos | |
| 7. De la arteria gástrica izquierda | |
| 8. De la arteria hepática común | |
| 9. Del tronco celíaco | |
| 10. Hilio esplénico | |
| 11. De la arteria esplénica | |
| 12. Pedículo hepático (arteria hepática propia) | |
| 13. Retropancreáticos | |
| 14. Raíz del mesenterio | |
| 15. De la arteria cólica media | |
| 16. Paraaórticos | |

Los resultados de la cirugía en Japón muestran una mayor supervivencia a los 5 años que en los países occidentales. Estos datos no pueden explicarse sólo por una mayor proporción de pacientes con tumores en estadio precoz, ya que las comparaciones estadio a estadio también revelan una mayor supervivencia en los pacientes japoneses. Los mejores resultados de la cirugía en Japón se atribuyen a la realización rutinaria de las linfadenectomías más radicales (gastrectomías D2-D3) que las habituales en occidente (gastrectomías D1).

En Europa y en EEUU la realización de gastrectomías D2 tiene resultados contradictorios. Tres estudios aleatorios comparando resecciones D1 y D2 han comunicado una mayor tasa de morbilidad de la segunda y una supervivencia a los 5 años similar. Se han dado varias razones para explicar estos resultados como la experiencia del cirujano y la frecuencia con la que los pacientes occidentales presentan otros problemas médicos asociados. Sin embargo, otros estudios han publicado resultados similares a los logrados en Japón.

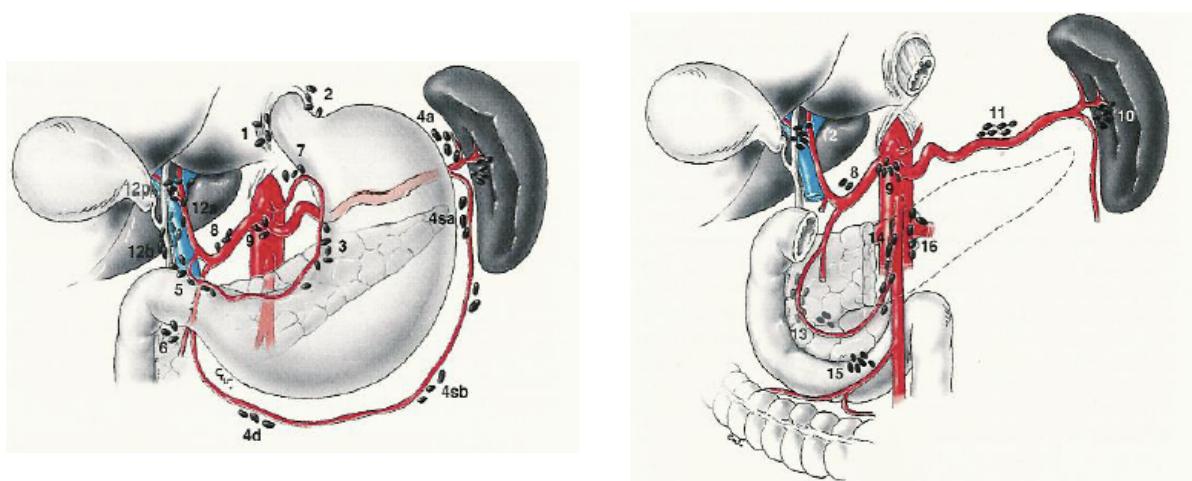


Figura 3: distribución de los grupos ganglionares en las diferentes estaciones.
Encyclopédie Médico-Chirurgicale.

1.2.3.2.Técnicas de reconstrucción

Tras la gastrectomía subtotal podemos realizar una reconstrucción Billroth I (gastroduodenostomía), Billroth II (gastroyeyunostomía) o una gastroyeyunostomía sobre una Y de Roux (el llamado Billroth III).

El gastrectomizado total presenta problemas más complejos. En general, se trata de pacientes que no están contentos con la intervención. Se quejan de sensación de plenitud postprandial, con pirosis y pérdida de peso importante que configuran, junto a una serie de alteraciones metabólicas, el llamado “síndrome de agastria”. En el gastrectomizado total por cáncer esta mala situación del paciente puede deberse a la persistencia o recidiva de la enfermedad neoplásica, posibilidad que debe valorarse meticulosamente en todos los casos. Sin embargo, el gastrectomizado total por afecciones benignas también presenta estos problemas, aunque menos importantes. En principio, podría pensarse que el síndrome de agastria se debe a que el estómago posee funciones metabólicas insustituibles que, al faltar, conducen al adelgazamiento progresivo del paciente. Ahora bien, la mayoría de autores consideran que los principales factores responsables de este síndrome son:

- El reflujo alcalino hacia el esófago, que condiciona una esofagitis importante, responsable de muchas de las molestias que presenta el paciente.
- La falta de un reservorio que condiciona sensación de saciedad precoz y que va a obligar al paciente a ingestas muy reducidas.

Con estas premisas, la técnica que reconstruye el tránsito digestivo tras una gastrectomía total debe buscar dos objetivos: suprimir el reflujo biliar hacia el esófago y crear un reservorio.

La anastomosis directa entre esófago y duodeno debe condenarse, ya que facilita extraordinariamente el reflujo y no proporciona reservorio. Es preferible anastomosar el esófago al yeyuno. Esta esofagoyeyunostomía puede hacerse de dos formas:

- Con el asa “en omega” y anastomosando el asa descendente al pie del

asa para permitir que la bilis y el jugo pancreático pasen por esta anastomosis, sin necesidad de transitar por la anastomosis esofagoyeyunal (fig.4).

- Con el asa en Y de Roux, dejando una larga distancia (no menos de 40 cm) entre la anastomosis esofagoyeyunal y la anastomosis al pie de asa. Esta intervención es la que mejor asegura la ausencia de reflujo alcalino al esófago, ya que la bilis y el jugo pancreático deberían ascender por el asa yeyunal más de 40 cm en sentido antiperistáltico (fig.4).

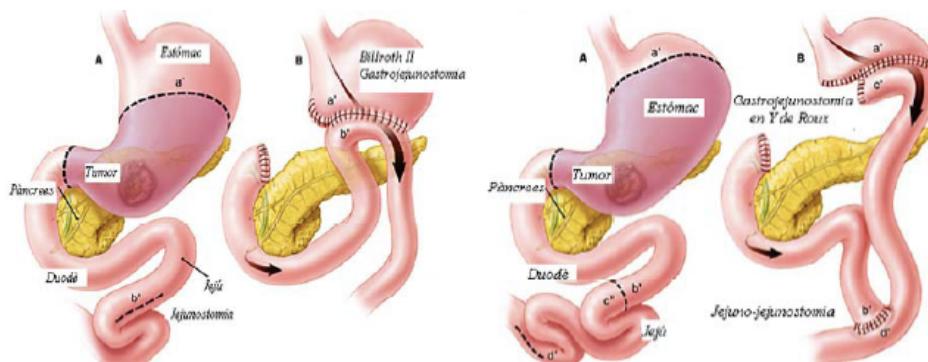


Figura 4: técnicas de reconstrucción. Gastrectomía subtotal + BII (izquierda) . Gastrectomía subtotal + Y de Roux (derecha). www.jhu.edu

La utilidad del reservorio es más cuestionable. Algunos autores le dan gran valor y defienden su creación según distintos procedimientos, sobre todo en pacientes con buen pronóstico. En cambio, otros autores, no comunican que el reservorio represente una mejoría sustancial de la calidad de vida y señalan que, por otra parte, su construcción alarga el tiempo de la operación⁸⁶.

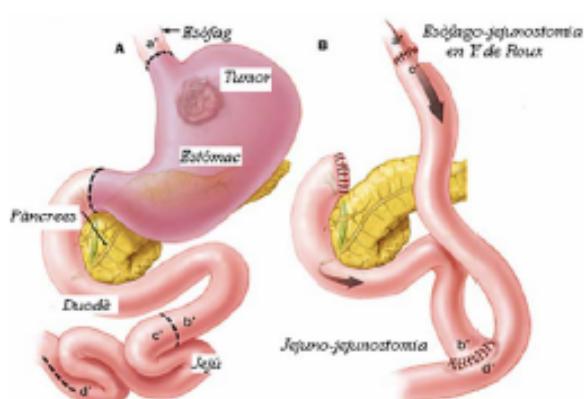


Figura 5: Gastrectomía total + Y de Roux. www.jhu.edu

1.2.4.Protocolo de seguimiento

Aunque no hay unanimidad respecto a la frecuencia y exploraciones, ni está demostrada la utilidad de la detección precoz de la recidiva ya que no hay un tratamiento de rescate eficaz, todo paciente con cáncer gástrico debe ser seguido sistemáticamente.

El control debe incluir una historia clínica completa, exploración física y analítica cada 3 meses los 2 primeros años y cada 6 meses otros 3 años. La radiografía de tórax debe realizarse cada 6 o 12 meses. Otras exploraciones, como la endoscopia, sólo deben realizarse si hay indicación clínica⁶⁰.

1.2.5.Tratamiento de las recidivas

En general se basa en la quimioterapia o tratamiento de apoyo según el estado general del paciente. El tratamiento de apoyo va dirigido a tratar los síntomas del paciente e incluye las prótesis, el láser, el tratamiento fotodinámico, la radioterapia o una combinación de estos. El papel de la resección en la recidiva locorregional es controvertido⁶⁰.

1.3.Respuesta inmunitaria

Tradicionalmente el término inflamación se ha utilizado para referirse a la reacción histopatológica por la que se acumulan en los tejidos líquido y leucocitos circulantes en respuesta a una lesión o a una infección. Desde hace mucho tiempo (3000 a. de C) ya aparecían escritos sobre signos de inflamación, sin embargo la primera persona que describe los signos de inflamación (calor, rubor, dolor y tumefacción) fue Celsus, en el siglo I d. de C. Fue en 1793 cuando se habla de la inflamación como un proceso benéfico y saludable para el organismo y no fue hasta los años de 1800 cuando se observaron cambios vasculares que acompañaban al proceso inflamatorio. En 1882 el biólogo ruso Elie Metchnikoff descubre el proceso de fagocitosis, al observar la ingestión de bacterias por leucocitos de mamífero, quedando claro para esa época que tanto los factores celulares (fagocitos) como los factores séricos (anticuerpos) eran imprescindibles dentro de los procesos de la inflamación. Posteriormente se descubre la participación además de sustancias químicas inducidas localmente por la injuria, como la histamina, que producen las alteraciones vasculares de la inflamación. En su acepción actual, este término no sólo denota unos efectos localizados, como edema, hiperemia e infiltración leucocitaria, sino también fenómenos sistémicos, como fiebre y aumento de la síntesis de determinadas proteínas de fase aguda (fig.6). La respuesta inflamatoria está estrechamente interrelacionada con los procesos de la cicatrización y de la reparación. De hecho, la cicatrización no es posible sin la inflamación. Por consiguiente la inflamación influye prácticamente en todos los aspectos de la cirugía, ya que la correcta cicatrización de las heridas traumáticas, las incisiones quirúrgicas y los diferentes tipos de anastomosis dependen totalmente de la expresión de un proceso inflamatorio perfectamente orquestado y controlado.

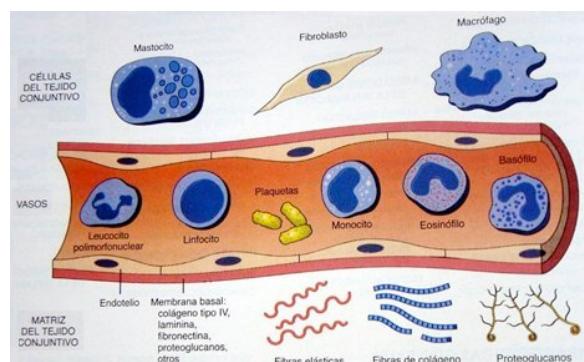


Figura 6: fenómeno de respuesta inflamatoria.

<http://miltonpinedo.blogspot.com.es/2010/12/conceptos-sobre-inflamacion-y.html>

La inflamación es fundamentalmente una respuesta protectora que ha evolucionado para permitir que las formas de vida superiores se libren de los agentes nocivos, supriman las células necróticas y los restos celulares y reparen sus tejidos y órganos. Sin embargo, los mecanismos empleados para eliminar los microorganismos invasores o ingerir y destruir las células desvitalizadas como parte de la respuesta inflamatoria pueden resultar también nocivos para los tejidos normales. Por consiguiente, la inflamación es un mecanismo patógeno importante que está presente en numerosos trastornos y síndromes. Muchos de estos procesos patológicos, como la enfermedad inflamatoria intestinal, la sepsis y el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), tienen una gran importancia en la práctica quirúrgica (fig.7).

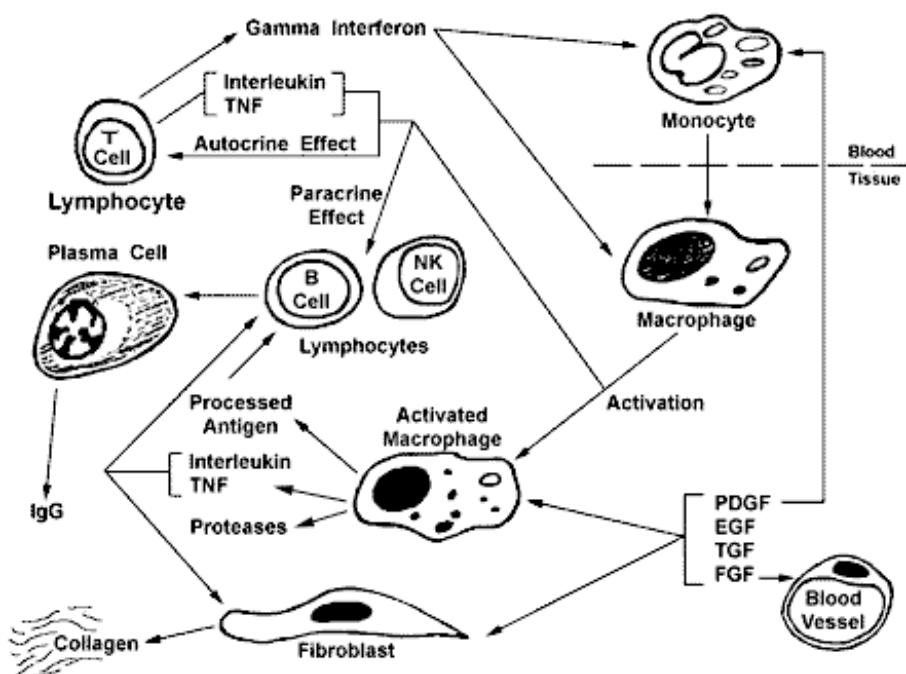


Figura 7: cadena respuesta inflamatoria.
<http://www.caninum.com/atlas/inflamacion/index.htm>

El inicio, el mantenimiento y la interrupción de la respuesta inflamatoria son procesos muy complejos en los que intervienen diferentes tipos de células, así como centenares de mediadores humorales. Uno de los grupos de mediadores inflamatorios humorales más importantes son las proteínas denominadas citocinas.

Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de pequeño tamaño que se secretan con el objeto de alterar la función de unas células diana mediante un mecanismo endocrino, paracrino o autocrino. A diferencia de las hormonas convencionales, como la insulina o la tiroxina, las citocinas no son secretadas por glándulas especializadas sino sintetizadas por células que actúan por su cuenta (p. ej. linfocitos o macrófagos) o formando parte de un tejido (p. ej. epitelio intestinal). Muchas citocinas son pleiotrópicas; estas citocinas pueden inducir muchos efectos biológicos diferentes, dependiendo de los tipos de células diana implicadas y de la presencia o ausencia de otros factores moduladores. Otra característica de las citocinas es la redundancia: es decir, varias citocinas diferentes pueden ejercer efectos biológicos muy parecidos.

En conjunto, se han identificado y caracterizado centenares de proteínas solubles que participan en la señalización intercelular y que reciben distintos nombres como citocinas, quimiocinas, interleucinas, factores estimuladores de colonias y factores de crecimiento.

Las citocinas pueden clasificarse atendiendo a varios esquemas diferentes, todos ellos algo arbitrarios y nunca plenamente satisfactorios. Según una nomenclatura anticuada, las citocinas se clasificaban *en función del tipo de célula responsable de su síntesis*; las citocinas sintetizadas por los linfocitos recibían el nombre de linfocinas, mientras que las secretadas por los macrófagos o los monocitos se denominaban monocinas. Sin embargo, las citocinas pueden ser producidas por más de un tipo de células. Debido a ello, en la bibliografía actual no suelen emplearse los términos linfocina y monocina.

Otra forma de clasificar las citocinas es *atendiendo a su estructura básica*. Así, por ejemplo, *las citocinas de tipo I* son un grupo muy amplio de proteínas que comparten una misma estructura terciaria característica, formada por un haz de cuatro hélices α . Los receptores para las citocinas de tipo I comparten igualmente una estructura similar y reciben el nombre de receptores de citocinas tipo I. Las citocinas de tipo I incluyen las siguientes proteínas: Interleucina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15 y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Las *citocinas de tipo II*

incluyen el interferón (IFN)- α , INF- β , INF- γ e IL-10, y constituyen un segundo grupo de proteínas con una estructura parecida. Los receptores de grupo de citocinas tipo II poseen también una estructura similar.

Otra forma de clasificar las citocinas se basa en el hecho de que las células T CD4+ vírgenes (células Th0) pueden diferenciarse el cualquiera de los subgrupos de células T auxiliares (Th), denominados *Th1* y *Th2*. Las células Th1, responsables de dirigir las respuestas inmunitarias celulares necesarias para erradicar los microorganismos patógenos intracelulares, favorecen la activación de los macrófagos. Las células Th2 podrían intervenir en la patogenia de la atopía y la inflamación alérgica y favorecer el crecimiento y la diferenciación de las células B. Las células Th1 sintetizan las IL-2 y también unas citocinas proinflamatorias muy potentes. INF- γ y linfotoxina (LT)- α . Las células Th2 sintetizan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. IL-4, IL-10, IL-13 y, en alguna medida IL-6 tienen fundamentalmente efectos antiinflamatorios. Debido a ello se dice que las citocinas Th1 son proinflamatorias, mientras que las de Th2 serían antiinflamatorias. La citocina IL-12 dirige la diferenciación de Th1, mientras que IL-4 induce la diferenciación de Th2².

Hay una familia especial de citocinas, las quimiocinas, formada por proteínas pequeñas con un peso molecular entre 8 y 11 kD. La principal actividad biológica de las quimiocinas es su capacidad para actuar como quimioactivos para los leucocitos o los fibroblastos. Otra subclase de citocinas es un grupo de proteínas que actúan fundamentalmente estimulando el crecimiento o la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas; estos mediadores reciben el nombre genérico de *factores estimuladores de colonias*. También entran en la categoría general de las citocinas otros *factores de crecimiento y diferenciación*, como los distintos factores de crecimiento de origen plaquetario, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de los queratinocitos⁸⁷.

La agresión que representa una intervención quirúrgica determina una serie de alteraciones de la respuesta inflamatoria descrita y de la función inmunitaria en el huésped, que están directamente relacionadas con la

importancia de la lesión. La inmunosupresión producida tras un traumatismo se relaciona con un incremento en la incidencia de complicaciones sépticas⁸⁸. Hoy en día existe una evidencia ampliamente aceptada, en base a estudios a cerca de colecistectomía y la cirugía del colon por vía laparoscópica, de que la cirugía laparoscópica se acompaña de una menor respuesta inflamatoria, evaluada mediante diversos marcadores (IL-6; PCR), y que se interpreta como consecuencia de una menor "cantidad de herida" entendida como una menor lesión tisular respecto a la cirugía abierta⁸⁹. Es de suponer que esta menor agresión conlleva una menor inmunosupresión, tal y como se ha demostrado en diversos estudios^{90 91}. El efecto de la CL se ha analizado sobre diferentes componentes del sistema inmunitario (linfocitos T [test de hipersensibilidad retardada, DTH], sistema mononuclear fagocítico y neutrófilos (ácido hipoclórico, PMN-elastasa y anión superóxido)^{92 93 94} comprobando una mayor alteración tras la cirugía abierta respecto a la laparoscópica. Todo ello confirma la mejor integridad global del sistema inmunitario tras la CL respecto a la cirugía abierta.

Hay que destacar la importancia de la membrana peritoneal en la respuesta inflamatoria a la hora de provocar un estrés quirúrgico. Por ello es importante que conozcamos las bases de la fisiopatología e histología del mismo (fig.8).

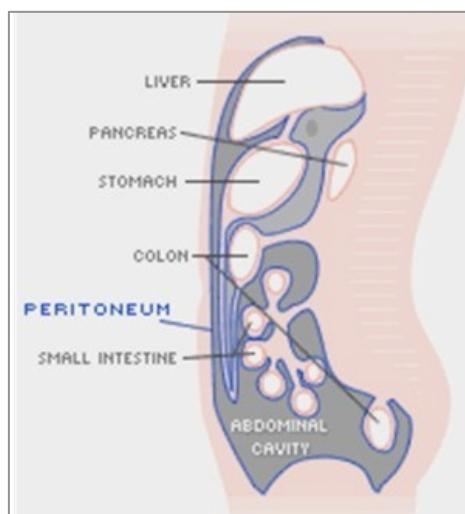


Figura 8: membrana peritoneal en la cavidad abdominal.
<http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Peritoneo01.htm>

La membrana peritoneal es una membrana serosa cuya área es similar a la superficie corporal y además posee irrigación propia. El 80% del peritoneo es

peritoneo visceral, su circulación proviene de las arterias mesentéricas y su flujo de salida se dirige principalmente hacia la vena porta; el resto es peritoneo parietal, cuya irrigación proviene en su mayor parte de arterias y venas de la pared abdominal. La membrana peritoneal consta de una monocapa de células mesoteliales productoras de fluido lubricante y bajo esta capa hay una esponja de tejido conjuntivo laxo, muy rica en vasos sanguíneos y linfáticos. El conocimiento de las células mesoteliales ha ido cambiando en los diez últimos años; inicialmente se las consideraba sólo como un grupo de células por las que transcurrían fluidos y solutos desde un lado hacia otro, pero luego se descubrió que ejercen gran cantidad de funciones: como toda célula constituyente de serosa, pueden producir surfactante; poseen canales de acuaporina I inducibles, en la medida en que se exponen a concentraciones mayores de glucosa; producen citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento (TGF, MGF, VEGF, FGF, PGF), que pueden participar en respuestas inflamatorias y fibróticas a medio y largo plazo; expresan in vitro todos los componentes del sistema renina-angiotensina; finalmente, un aspecto muy importante es que se pueden transformar en fibroblastos, migrar hacia el interior del tejido conectivo subyacente y promover fenómenos de fibrosis.

El principal mediador de la respuesta local frente a la agresión peritoneal son las células mesoteliales, muy sensibles a la lesión del peritoneo. Ante un estrés peritoneal, dichas células se desprenden de éste y liberan sustancias vasoactivas y tromboplastina, que transforma el fibrinógeno en fibrina (lo cual es la base de las adherencias postoperatorias). Los inhibidores de este proceso (activador del plasminógeno) presentes en la superficie peritoneal son inactivados por acción de la contaminación peritoneal. El peritoneo presenta diferentes mecanismos de defensa ante una agresión como es un acto quirúrgico:

- En primer lugar la eliminación mecánica a través de los linfáticos diafrágmáticos siendo el primero que interviene, así a los 12 minutos de la entrada de bacterias en el peritoneo, éstas, se pueden encontrar en los linfáticos mediastínicos.
- Destrucción por las células fagocíticas. Inicialmente por macrófagos presentes en el peritoneo y posteriormente por neutrófilos, que

constituyen las principales células fagocíticas.

- Secuestro y aislamiento, proceso que se ve favorecido por el alto contenido en fibrina del exudado peritoneal.

Toda esta reacción ante una actuación externa se presenta, como ya hemos señalado anteriormente, en menor medida en el abordaje laparoscópico, tal y como han demostrado diversos estudios⁸⁸⁻⁹⁴.

Además el neumoperitoneo ejerce un efecto directo sobre los sistemas de defensa peritoneal por dos mecanismos: uno como consecuencia de la distensión mecánica de la cubierta peritoneal y otro por la influencia del tipo de gas utilizado, con independencia del efecto puramente físico que representa el aumento de presión.

El neumoperitoneo provoca cambios morfológicos demostrados por microscopía electrónica de la estructura del peritoneo, que no se observan tras la cirugía abierta y que son proporcionales a la duración del neumoperitoneo. Estas lesiones se caracterizan por la pérdida de contacto y fisuras entre las células mesoteliales y la aparición de un infiltrado eritrocitario y de macrófagos. Estos cambios se ven acelerados cuando el neumoperitoneo se efectúa en un ambiente séptico^{95 96}.

Otro aspecto corresponde al efecto directo del gas utilizado y su posible acción sobre los mediadores intraperitoneales de la respuesta a la infección (macrófagos). West et al^{97 98} investigaron la producción de citocinas por los macrófagos peritoneales incubados en CO₂. La producción de TNF e IL-1 en respuesta a la endotoxina bacteriana por macrófagos incubados en un ambiente de CO₂ fue menor que en aire o helio. El mecanismo propuesto para justificar estas diferencias es que el CO₂ afecta al medio intracelular creando un ambiente ácido. Este hallazgo fue confirmado por Wunsch et al⁹⁹ al observar que las ratas insufladas con CO₂ presentaban una significativa disminución del pH intraabdominal respecto a las insufladas con aire ambiente o helio. Estos resultados supondrían que la modificación de la fisiología celular del macrófago durante la CL conllevaría una peor respuesta peritoneal a la infección. Sin

embargo, Iwanaka et al¹⁰⁰ observaron un mayor número y una mayor viabilidad de los macrófagos peritoneales tras el neumoperitoneo con CO₂ que tras una laparotomía. A la vez, la producción de citocinas y NO fue menor en el grupo laparoscópico que en el abierto¹⁰¹. Estos resultados se interpretaron como consecuencia del mayor estrés celular tras la cirugía abierta, y no, en contraste con los resultados de West, como una anomalía en el funcionamiento de los macrófagos en ambiente con CO₂. Por otra parte, Evrard et al¹⁰² evaluaron el efecto potencial del CO₂ en la inmunidad celular peritoneal y sistémica, argumentando que la viabilidad de los linfocitos T depende del pH. Sin embargo, no hallaron diferencias significativas antes o después del neumoperitoneo. Watson et al¹⁰³ evaluaron el efecto de diferentes factores del aire ambiente en la respuesta inflamatoria a la cirugía y observaron una disminución de la actividad fagocitaria en el grupo sometido a cirugía abierta respecto al sometido a laparoscopia. Estos autores consideraron que el lipopolisacárido (LPS) del aire era el factor inductor, puesto que cuando inocularon CO₂ con LPS, los resultados fueron similares a los del grupo abierto.

Estos resultados permiten suponer que tanto el efecto puramente mecánico como el efecto directo del CO₂ modifican la capacidad de respuesta de los mecanismos celulares peritoneales. Sin embargo, ésta se mantiene mejor preservada que tras la cirugía abierta y el balance final es favorable a la CL. A la vez, la utilidad o ventajas de gases alternativos al CO₂ (helio, etc.) es una área de investigación a desarrollar.

2.HIPOTESIS

El abordaje laparoscópico del cáncer gástrico ofrece ventajas en cuanto a la recuperación a corto plazo del paciente, si bien dichas diferencias no han sido justificadas desde el punto de vista fisiopatológico. Estudios previos en otras patologías han demostrado que el abordaje laparoscópico genera una menor respuesta humorar y celular sistémica. La respuesta inflamatoria a nivel local en gastrectomías no ha sido estudiada hasta la fecha y los escasos trabajos que evalúan el impacto a nivel inflamatorio del procedimiento en comparación con cirugía abierta emplean una metodología deficiente.

1. Existen diferencias en la respuesta inflamatoria local generada en la gastrectomía en función del tipo de abordaje empleado.
2. El abordaje laparoscópico en la cirugía del cáncer gástrico genera una menor respuesta inflamatoria a nivel peritoneal en comparación con el abordaje abierto.
3. Las diferencias hasta ahora observadas en parámetros clínicos de pacientes intervenidos por cáncer gástrico, favorables a la cirugía laparoscópica en cuanto a su recuperación y curso postoperatorio, tienen como base las diferencias en la respuesta inmune originada según el tipo de agresión quirúrgica.

2.1.Objetivos

Para comprobar esta hipótesis se han planteado los siguientes objetivos:

- El **objetivo principal** que se plantea es analizar los aspectos diferenciales en la respuesta inflamatoria en pacientes gastrectomizados por vía abierta (CA) frente a laparoscópica (CL), estudiando la respuesta inflamatoria local en tejido peritoneal al inicio y a la hora de la intervención, mediante el análisis de la expresión de mediadores inflamatorios empleando *protein microarrays*.

- Como **objetivo secundario** se plantea realizar un seguimiento prospectivo clínico inmediato y a corto-medio plazo de los pacientes y correlacionar las posibles diferencias en la respuesta inflamatoria con variables clínicas relacionadas con el estado general del enfermo, procedimiento en sí mismo y la enfermedad neoplásica de base.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Una vez establecidos los objetivos del trabajo analizaremos los resultados obtenidos en ambos grupos: pacientes gastrectomizados por vía abierta frente a laparoscópica. Es por tanto un estudio comparativo de dos grupos prospectivo, longitudinal, observacional; en el que se analizan las variables a estudio de 26 pacientes sometidos a CL (12 pacientes) o a CA (14 pacientes). Los grupos a estudio son:

- ***Grupo 1 (laparoscopia):*** pacientes diagnosticados de cáncer gástrico a los que se les practica una gastrectomía por vía laparoscópica entre Junio de 2010 y Abril de 2012.
- ***Grupo 2 (laparotomía):*** pacientes diagnosticados de cáncer gástrico a los que se les practica una gastrectomía por vía convencional entre Junio 2010 y Abril 2012.

3.1.1. Material utilizado en el grupo 1

A continuación detallamos el material utilizado, que desglosaremos en dos componentes:

Columna de laparoscopia:

- **Equipo de neumoperitoneo:** el gas utilizado ha sido siempre CO₂. En toda la serie se han empleado insufladores automáticos, con una presión fijada entre 11 y 14 mmHg.
- **Equipo de iluminación e imagen:** constituido por un laparoscopio con una cámara de video, una fuente de iluminación y un monitor de televisión.

Instrumental quirúrgico laparoscópico: Material para la instauración y el mantenimiento del neumoperitoneo y para permitir la entrada del instrumental a través de la pared abdominal (Trócar de Hasson, 3 trócares de 5 mm y 1 de 12 mm, Hand port).

Instrumental quirúrgico: pinzas atraumáticas, disector de gancho, separador hepático, aspirador-irrigador, tijeras, disector, porta agujas, electrocauterio, aplicador de endoclips, sellador de vasos de 5-10 mm, endograpadoras.

3.1.2.Material utilizado en el grupo 2

El material quirúrgico es el que se utiliza de forma convencional en la cirugía abierta gastroesofágica en una laparotomía media y/o subcostal bilateral

3.2.Población diana. Criterios de inclusión y exclusión

Se han incluido todos los pacientes intervenidos de neoplasia gástrica por vía laparoscópica y vía abierta desde Junio de 2010 hasta Abril de 2012, con una edad comprendida entre los 18-80 años, sin restricción de género ni localización de la neoplasia que no presentaran ninguno de los siguientes criterios de exclusión:

1. Estudio de extensión que demuestre enfermedad a distancia.
2. Pacientes con un índice de Karfnofsky <= 70% o estadio IV de la clasificación de ASA que no sean tributarios de tratamiento quirúrgico.
3. Pacientes en los que durante la intervención quirúrgica se haya evidenciado algún motivo de irresecabilidad que haya desestimado la resección.
4. Pacientes sometidos a cirugía paliativa.
5. Pacientes sometidos a cirugía no R0.
6. Neoplasias gástricas de estirpe diferente al adenocarcinoma.
7. Tumores de cardias Siewert I.
8. Pacientes intervenidos de urgencias por complicación de su neoplasia.

La población a analizar serán ambos grupos de pacientes (vía abierta vs laparoscópica), realizando un estudio comparativo prospectivo longitudinal, realizándose la intervención quirúrgica por una u otra vía dependiendo de la

experiencia del primer cirujano y de las características del paciente (IMC, intervenciones previas, comorbilidad asociada....).

Previo a la cirugía, nuestros pacientes son estudiados mediante una serie de pruebas de gabinete, laboratorio e imagen (fibrogastroscopia, biopsia, ecoendoscopia, TC toraco-abdominal, analítica general, tránsito esófago-gastro-duodenal), para decidir el plan terapéutico en cada caso. Además es necesario proceder a un estudio nutricional antes de iniciar cualquier plan. En función de los resultados obtenidos en el estudio preliminar, se procederá a la realización de uno de los siguientes esquemas de tratamiento:

Tratamiento Neoadyuvante: serán sometidos a tratamiento neoadyuvante todos los pacientes con tumores localmente avanzados definidos ya sea por técnicas de imagen o quirúrgicamente como T3 o T4 o N+. Se realizarán 3 ciclos de QT neoadyuvante, posteriormente reestadificación y se programará la intervención a las 4 semanas.

Cirugía: serán sometidos a tratamiento quirúrgico todos los pacientes con un riesgo quirúrgico anestésico asumible estatificado como T1, T2 N0 en la estadificación inicial o T3, T4 o N+ que han seguido tratamiento neoadyuvante. Serán parámetros que contraindicarán de forma absoluta la cirugía la presencia de enfermedad intercurrente grave de curso crónico, existencia de metástasis a distancia o afectación grave del funcionalismo respiratorio (FEV1 < 1.500 cc; pO₂ < 75 mm Hg).

Tratamiento Adyuvante: serán sometidos a tratamiento adyuvante aquellos pacientes en los que el resultado de la anatomía patológica sea pT3/pT4 o N+, que hayan sido sometidos a una cirugía R0 y linfadenectomía D1-3. O bien aquellos casos en los que la cirugía haya sido R1 o R2 o la linfadenectomía D0, asociando además RDT.

3.3. Protocolo de actuación, intervención y recogida de muestras

3.3.1. Estudio preoperatorio estándar (igual en ambos grupos)

Todos los pacientes de la serie se han sometido al mismo protocolo de estudio diagnóstico:

- Anamnesis
- Estudio preoperatorio estándar (Analítica - Hemograma, hemostasia, bioquímica, marcadores tumorales, radiografía de tórax, electrocardiograma, exploraciones complementarias específicas de la neoplasia gástrica, valoración anestésica)
- Valoración por el Comité de Tumores (multidisciplinar: Cirujanos, Digestólogos, Oncólogos, Radioterapeutas y Radiólogos).

3.3.2. Pauta de preparación preoperatoria (igual en ambos grupos)

- Preparación nutricional
- Pauta de preparación intestinal
- Rehabilitación
- Colocación de vías previas
- Reserva de sangre para el acto quirúrgico
- Profilaxis antibiótica y tromboembólica
- Tratamiento sedante

3.3.3. Actividad preoperatoria inmediata (igual en ambos grupos)

- Maniobras de instrumentación (vías arteriales y venosas, sonda digestiva, urinaria, catéter epidural.....)

- Colocación del paciente
- Mantenimiento de la temperatura
- Equipos quirúrgicos
- Requerimientos de instrumentación específica

3.3.4. Acto quirúrgico

Grupo 1 (laparoscópico)

Una vez realizada la actividad anestésica, el paciente se coloca en decúbito supino con los miembros inferiores en abducción y ligeramente flexionados. Posteriormente se procede a la colocación del equipo quirúrgico (fig.9), los trocares de trabajo y la realización de la cirugía (Gastrectomía total/subtotal junto con Linfadenectomía según el tipo del tumor).

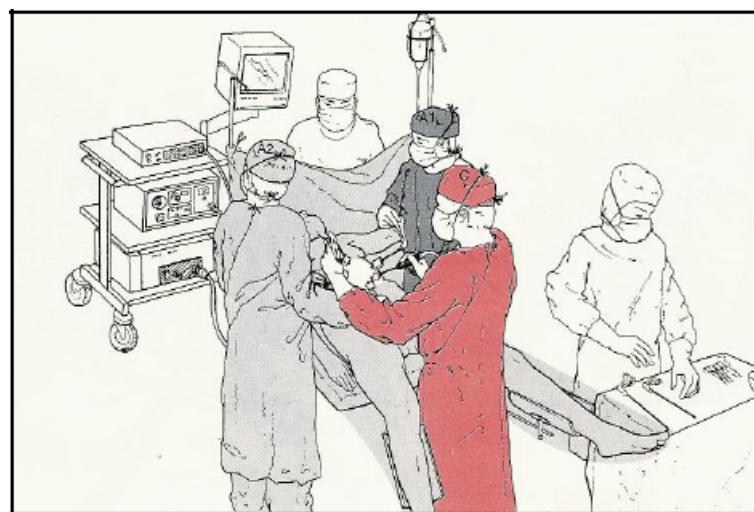


Figura 9: colocación del equipo quirúrgico CL.
Encyclopédie Médico-Chirurgicale.

Grupo 2 (laparotomía)

Una vez realizada la actividad anestésica previa a la cirugía se procede a la intervención. El paciente se coloca en decúbito supino. La vía de abordaje principal es una laparotomía subcostal bilateral (laparotomía media en algún

caso), a través de la cual se revisa la cavidad abdominal para valorar la resecabilidad del tumor y la presencia de lesiones a distancia. Del mismo modo se procede a la realización de una Gastrectomía total/subtotal con Linfadenectomía según el tipo del tumor.

3.3.5. Recogida de muestras – Colección del tejido (igual en ambos grupos)

Como ya hemos señalado previamente, hay que destacar la importancia del peritoneo en la respuesta inmunitaria a la hora de provocar un estrés quirúrgico. Por ellos hemos basado nuestro estudio en la recogida de muestras peritoneales para analizar la respuesta inflamatoria a nivel local en la cirugía del cáncer gástrico, ya sea por laparotomía convencional o por laparoscopia. A continuación detallaremos la parte técnica del proceso de recogida y el método de análisis.

Este procedimiento tiene por objeto garantizar que las muestras de tejidos recogidos de pacientes que han consentido (mediante consentimiento informado), se conserven de manera segura, oportuna y eficiente, evitando riesgos de contaminación. Para facilitar el uso de las técnicas genómicas, proteómicas e histológicas es vital un proceso adecuado de recolección, y transporte. Una rápida conservación de las muestras garantiza la obtención de productos con alta integridad y calidad.

3.3.5.1. Consideraciones generales

1. La utilidad científica de los datos obtenidos del análisis del tejido se encuentra directamente relacionada con la calidad del espécimen tisular.
2. La integridad celular y molecular se encuentra afectada por varios factores como son el tipo de tejido, las condiciones de hipoxia tisular, el método de conservación, las condiciones de almacenamiento, la hipoxia antes de la escisión y los métodos de extracción para los productos

tisulares. Los siguientes factores se han tenido en cuenta durante el proceso de obtención y mantenimiento del tejido para garantizar la integridad de éste para ser utilizado en investigación:

- Minimizar el tiempo en el que el tejido es sometido a condiciones de hipoxia, para evitar iniciar los mecanismos de muerte celular y subsiguientes procesos de degradación.
- Utilizar agentes o tratamientos para inactivar la degradación enzimática para conservar la integridad de los ácidos nucleicos.
- La preservación de tejido fresco congelado, si el uso es para análisis del ácido nucleico.
- Almacenar el tejido congelado y sus productos a temperaturas apropiadas, especialmente si el almacenamiento es para largos períodos de tiempo.
- Evitar la contaminación entre distintos tejidos histológicos o procesados a la vez, si el producto está destinado a estudios de amplificación de ácidos nucleicos.
- No colocar el tejido en formol o derivados si se desea conservar tejido fresco congelado.

3.3.5.2. Transporte del tejido

1. Inmediatamente después de haber sido notificado por el personal de quirófano (o por la persona responsable de la identificación de la disponibilidad del espécimen) de la existencia de tejido candidato, la persona responsable de la obtención de la muestra desde el quirófano organiza su transporte al laboratorio patológico (o laboratorio designado) de manera óptima para preservar la integridad celular y molecular.
2. La persona delegada responsable toma una porción de tejido del descarte quirúrgico, no necesario para el diagnóstico.
3. Se preparan previamente los kits de colección, preparación y almacén tisular, etiquetados según el tipo de muestra a recoger:
Nº paciente – A/L (CA o CL) – P(peritoneo) – 0/1 (tiempo 0 o 1) – R/N

(RNA later o Nitrógeno) – nº de muestra (1,2,3).

Ej: 01AP0R.1, 25LP1N.2

4. La movilización rápida de la pieza, no más de 30 minutos entre la resección y el inicio de su conservación.

El proceso de recogida de muestras se ha realizado siempre por el mismo personal médico y siguiendo la misma técnica de recogida y procesamiento de las mismas. Se procede a una extracción y procesado de tejido peritoneal en el momento del inicio de la cirugía (igual en ambas vías) y a tiempo 1 de la cirugía (1 hora tras haber iniciado el acto quirúrgico). El material extraído (aproximadamente 1-2 cm² de peritoneo) a tiempo 0 y a tiempo 1 es procesado de la siguiente manera:

Manipulación en ambiente estéril, mediante:

- talla y guantes estériles de quirófano
- material quirúrgico procedente de la cirugía que se está llevando a cabo

División de la muestra en 6 piezas que se distribuirán de la siguiente forma:

- muestras en criotubo estéril que contiene solución RNAlater® a T^a ambiente (posteriormente paso a nevera 4° y extracción del RNAlater® y cambio a - 80° C en congelador a las 24h)
- muestras en 3 criotubos estériles independientes que inmediatamente son congelados mediante Nitrógeno líquido (preservación mediante termo metálico homologado) y posteriormente son trasladadas una vez congeladas al Congelador -80°C.

Tras finalizar el acto quirúrgico, las muestras son trasladadas al Laboratorio de Inmunología para la Investigación y Aplicaciones Diagnósticas - Biobanco, ubicado en el edificio de investigación de nuestro complejo hospitalario Germans Trias i Pujol, para conservación en nevera y/o congelador tal y como se ha expuesto en el punto anterior.

3.3.5.3.Conservación del tejido en RNAlater®

Se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Tratado del tejido como potencialmente infeccioso.
2. Identificación y/o etiquetado de los crioviales, y preparación de todo el material antes del aviso desde quirófano.
3. Colocación en la solución RNAlater® inmediatamente, o dentro de los 30 minutos siguientes desde su resección.
4. Cuidado de que el tejido seccionado no se seque ni se contamine por contacto con otros tejidos o muestras. Utilización de pinzas, tijeras y bisturíes limpios y estériles, evitando contaminaciones cruzadas entre muestras o entre zona tumoral y tejido normal.
5. No contacto de la muestra con formol en ninguna etapa de su procesado. No adición de suero a la muestra.
6. Con ayuda de una tijera (para evitar desgarros) y unas pinzas estériles obtención de fragmentos de 0,2 x 0,2 x 0,2 cm.
7. Colocación con pinzas estériles de 3 fragmentos en el criotubo sumergidos en 0,5 ml de solución RNAlater®.
8. Incubación 24h a 4°C.
9. Posteriormente almacenamiento a -80°C: procedimiento realizado bajo las mismas condiciones de esterilidad y cuidado mencionados. Extracción del sobrante de RNAlater® y preservación de las muestras por separado en criotubos independientes en congelador -80°C.

3.3.5.4.Congelación rápida del tejido

Se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Tratado del tejido como potencialmente infeccioso.
2. Congelación llevada a cabo por la persona entrenada para ello.
3. Criotubos etiquetados y preparado de todo el material y equipos antes del aviso desde quirófano.
4. Congelación del tejido inmediatamente, o dentro de los 30 minutos siguientes desde su resección.
5. Cuidado de que el tejido seccionado no se seque ni se contamine por

- contacto con otros tejidos o muestras. Utilización de pinzas, tijeras y bisturíes limpios y estériles, evitando contaminaciones cruzadas entre muestras o entre zona tumoral y tejido normal.
6. El tejido congelado directamente es apto para la obtención de ADN, ARN y proteínas. No contacto de la muestra con formol en ninguna etapa de su procesado. No adición de suero a la muestra.
 7. Con ayuda de una tijera (para evitar desgarros) y unas pinzas estériles obtención de fragmentos de 0,2 x 0,2 x 0,2 cm 9.
 8. Colocación con pinzas estériles de 3 fragmentos en 3 criotubos independiente.
 9. Cierre de los criotubos e introducción en el nitrógeno líquido. Congelación del espécimen en 30-60 segundos.
 10. Transferencia de la muestras a un congelador de -80°C (transporte en termo resistente para nitrógeno líquido).

3.3.6.Postoperatorio inmediato (igual en ambos grupos)

El curso postoperatorio inmediato en la Unidad de Reanimación consta de los siguientes pasos:

- Normalización de la temperatura corporal
- Controles hemodinámicos y respiratorios
- Despertar
- Pauta analgésica
- Nutrición en las primeras horas
- Control de heridas y drenajes
- Fisioterapia respiratoria
- Profilaxis tromboembólica
- Control analítico y radiológico
- Cambios posturales
- Una vez en la planta el postoperatorio sigue la siguiente pauta:

- Atenciones de enfermería descritos en el apartado anterior
- Rehabilitación funcional
- Soporte psicológico
- Consejos dietéticos
- Tratamiento de las complicaciones

3.3.7.Alta médica

Una vez que el paciente tolere la dieta oral correctamente, se hayan retirado los drenajes abdominales y si no se ha presentado ninguna incidencia, se autoriza el alta dando unas pautas de control:

- Medicación analgésica y sedante
- Consejos nutricionales
- Atención de las heridas postoperatorias

3.3.8.Tratamiento adyuvante y neoadyuvante (igual en ambos grupos)

Los pacientes realizarán tratamiento adyuvante y/o neoadyuvante según los protocolos descritos y valoración previa por el Comité de Tumores.

3.3.9.Estudio anatomicopatológico (igual en ambos grupos)

La pieza quirúrgica se envía a Anatomía Patológica en formol. El patólogo hace un análisis y descripción macroscópica de la pieza:

- Tamaño de la pieza
- Localización y descripción del tumor
- Distancia al margen superior
- Distancia al margen inferior

- Medidas del tumor

A continuación se procede a la disección y recuento ganglionar (pTNM).

3.4. Procesamiento y análisis de muestras

El proceso de valoración de proteínas consta de 4 pasos principales:

1. Fragmentación del tejido de forma mecánica y manual con mortero y nitrógeno líquido.
2. Homogenización mediante gentleMACS Dissociator (MACS Milteny Biotec) en tubos M de la misma casa. Se utiliza un buffer de lisis específico para los arrays al que ponemos un cocktail inhibidor de proteasa. Centrifugamos y trabajamos con el sobrenadante.
3. Cuantificación de proteínas total mediante BCA (Thermo scientific).
4. Quantibody human TH17 array (Raybiotech).

Como ya hemos señalado, las citocinas juegan un importante papel en la inmunidad innata, apoptosis, angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular. Participan en interacciones entre diferentes tipos celulares, respuestas celulares según las condiciones ambientales, mantenimiento y homeostasis; así como en la mayoría de los procesos patológicos, incluidos cáncer y enfermedades cardíacas.

El método tradicional para detectar y cuantificar citocinas es a través de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En este método, la proteína diana está primero inmovilizada en un soporte sólido. A continuación forma un complejo con un anticuerpo que está ligado a una enzima. La detección de la enzima-complejo puede ser visualizado a través del uso de un sustrato que produce una señal detectable. Mientras que el método tradicional funciona bien para una única proteína, el procedimiento general consume mucho tiempo y requiere un gran tamaño de muestra. Con una muestra pequeña, la conservación de la misma se convierte en una tarea arriesgada.

Dados los avances en la tecnología de microarrays en la última década, hay actualmente más opciones disponibles para los científicos. Un líder de gran experiencia en el campo, Raybiotech, es pionero en el desarrollo de arrays de anticuerpos de citocinas, que ahora se ha aplicado ampliamente en la comunidad de investigación.

Quantibody Array ®, es una plataforma de matriz cuantitativa elaborada por Raybiotech basado en la tecnología de ELISA y permite a los investigadores determinar con precisión la concentración de citocinas de forma simultánea. Combina las ventajas de la alta sensibilidad de detección / especificidad de ELISA y el elevado rendimiento de las arrays. Igual que un método tradicional ELISA utiliza un par de anticuerpos específicos para la detección de citocinas. Un anticuerpo de captura se une primero a la superficie de vidrio-soporte sólido. Después de la incubación con el muestra, la citocina objetivo es atrapada en la superficie sólida. Un segundo complejo biotina-anticuerpo de detección se añade a continuación, que reconoce un isótopo diferente de la citocina objetivo. El complejo citocina-anticuerpo-biotina puede, a continuación ser visualizado a través de la adición de la estreptavidina marcada con colorante equivalente Cy3 utilizando un escáner láser. A diferencia del ELISA tradicional , Quantibody utiliza el formato de array. Al poner en orden varias citocinas específicas de anticuerpos de captura sobre un soporte de vidrio, la detección de múltiples citocinas en un experimento se hace posible.

En detalle, un portaobjetos de vidrio estándar es marcado con 16 pocillos de idénticos arrays de anticuerpos de citocinas. Cada anticuerpo, junto con los controles positivos es expuesto por cuadruplicado. La corredera incluye una junta extraíble de 16 pocillos lo que permite procesar 16 muestras en un dispositivo (fig.10).

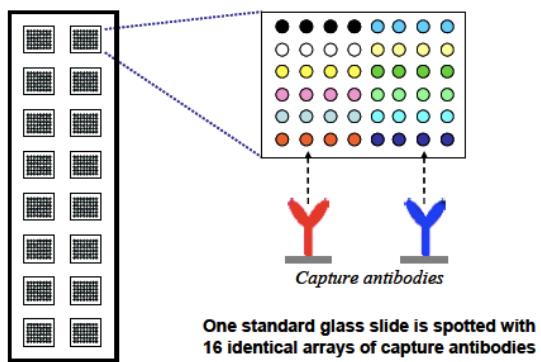


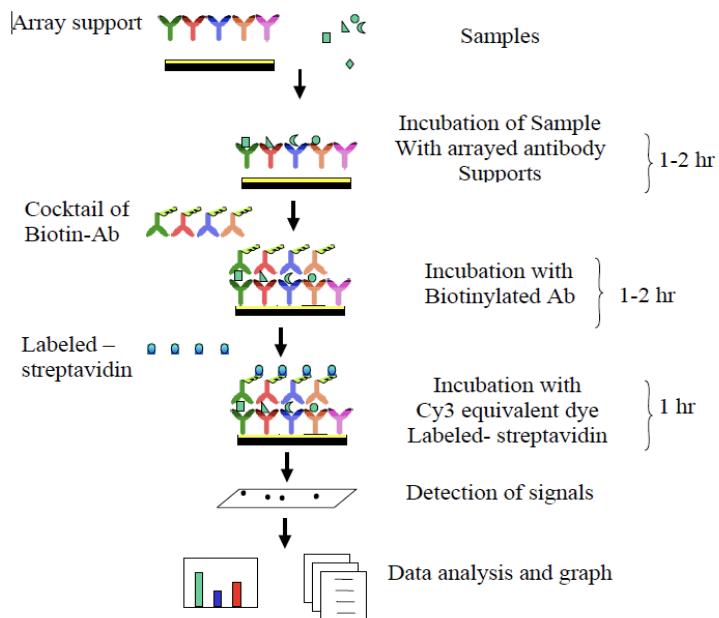
Figura 10: placa estándar arrays. *Protocolo Quantibody human TH17 array (Raybiotech)*

Pueden juntarse cuatro dispositivos en una bandeja, que coincide con una microplaca estándar y permite el proceso automatizado mediante robótica de alto rendimiento de 64 arrays de proteínas de forma simultánea. Para la cuantificación de citocinas, los estándares específicos del array de proteínas, cuya concentración ha sido predeterminada, pueden generar un curva para cada citocina. En un experimento real, las citocinas estándar y las muestras se ensayarán en cada array simultáneamente a través de la técnica ELISA. Al comparar las señales a partir de muestras desconocidas con la curva estándar, la concentración de citocinas en las muestras se determinará.

Se ha confirmado que Quantibody kits Array ® tiene una sensibilidad de detección similar al método tradicional ELISA. Los actuales equipos de alta densidad Quantibody permiten a los científicos determinar cuantitativamente la concentración de 200 citocinas humanas o 120 citoquinas de ratón en un solo experimento. Esto no sólo es uno de los productos más eficientes en el mercado para la cuantificación de citocinas, sino que además hace que sea más asequible la cuantificación de gran número de proteínas. La detección simultánea de múltiples citocinas, sin duda, proporciona una herramienta poderosa para los avances en medicamentos y el descubrimiento de biomarcadores (fig.11).

Figura 11: mecanismo de funcionamiento.

Protocolo Quantibody
human TH17 array
(Raybiotech)



3.4.1. Material empleado

Tras la recepción, todos los componentes del kit Quantibody array deben almacenarse a -20°C . A esta temperatura el kit conservará su actividad completa un máximo de 6 meses. Una vez descongelado, el chip de vidrio, la mezcla estándar de citocinas, el cóctel de detección de anticuerpos y el colorante conjugado Cy3 de Estreptavidina deben mantenerse a -20°C y todos los demás componentes se pueden almacenar a 4°C. El kit completo debe ser utilizado dentro de los 6 meses siguientes de la compra.

Componentes (Tabla 3)

| Item | Description | 1-Slide kit | 2-Slide kit |
|------|--|-------------|-------------|
| 1 | Quantibody® Array Glass Chip | 1 | 2 |
| 2 | Sample Diluent | 1 | 1 |
| 3 | 20X Wash Buffer I | 2 | 3 |
| 4 | 20X Wash Buffer II | 1 | 1 |
| 5 | Lyophilized cytokine standard mix * | 1 | 1 |
| 6 | Detection antibody cocktail | 1 | 2 |
| 7 | Cy3 equivalent dye-conjugated Streptavidin | 1 | 2 |
| 8 | Slide Washer/Dryer | 1 | 1 |
| 9 | Adhesive device sealer | 5 | 10 |
| 10 | Manual | 1 | 1 |

Tabla 3: Componentes. Protocolo Quantibody human TH17 array (Raybiotech)

Material adicional requerido

- Agitador orbital
- Escáner láser para la detección de fluorescencia
- Papel de aluminio
- Agua destilada
- Tubos de polipropileno de microcentrífuga 1,5 ml

3.4.2. Consideraciones generales

3.4.2.1. Preparación de las muestras

Utilizar medios libres de suero si es posible.

- Si es preciso emplear medios con suero, es altamente recomendable que el medio completo se utilice como control, ya que muchos tipos de sueros contienen citocinas.
- Se recomiendan los siguientes parámetros para las muestras: de 50 a 100 μ l de suero original o diluido, plasma, medios de cultivo celular, u otro fluido corporal, o 50-500 μ g/ml de proteína para lisis de células y tejidos.

3.4.2.2. Manejo de chips de vidrio

- No tocar la superficie de las diapositivas, las diapositivas de microarrays son muy sensibles. Sólo sujetar las transparencias por los bordes.
- Manejar todos los tampones y diapositivas con guantes libres de látex.
- Manejar chip de vidrio en el medio ambiente limpio.
- Debido a que no hay código de barras en la diapositiva, transcribir el número de la bolsa portaobjetos en la parte posterior de la corredera con un permanente antes de deshacerse de la bolsa de diapositivas.

3.4.2.3.Incubación

- Cubrir completamente el array con la muestra o tampón durante la incubación.
- Evitar la formación de espuma durante las etapas de incubación.
- Realizar toda la incubación y los pasos de lavado con rotación suave.
- Cubrir la cámara de incubación con una película adhesiva durante la incubación, particularmente cuando la incubación es más de 2 horas o se emplean < 70 µl de muestra o reactivo.
- Varios pasos de incubación, como el paso 6 (bloqueo), el paso 7 (muestra de incubación), el paso 10 (incubación de la detección de anticuerpos), o el paso 13 (incubación de Cy3 equivalente de colorante de Estreptavidina) se pueden hacer durante la noche a 4° C. Hay que asegurarse de cubrir la cámara de incubación con fuerza para evitar la evaporación.

3.4.3.Protocolo arrays de proteínas. Detalles del mismo.

Secar al aire completamente el chip de vidrio

1. Retirar el chip de vidrio de la caja, y dejar que se equilibre con la temperatura de la habitación en el interior de la bolsa de plástico sellada durante 20-30 minutos. Extraerlo de la bolsa de plástico; retirar la lámina protectora y dejar secar al aire a temperatura ambiente durante otras 1-2 horas.

Preparar diluciones de citocinas estándar (Fig.12)

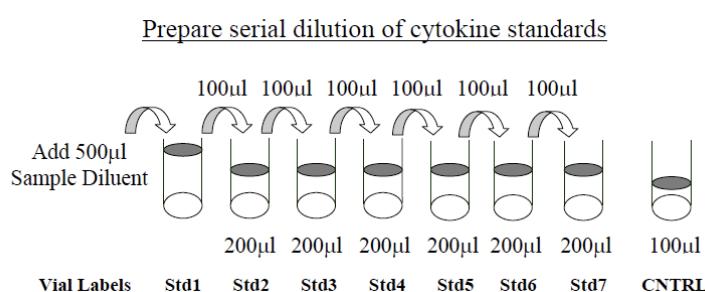


Figura 12: preparación de diluciones estándar. *Protocolo Quantibody human TH17 array (Raybiotech)*

2. Reconstituir la mezcla estándar de citocinas (liofilizado) mediante la adición de 500 µl de diluyente de muestras en el tubo. Para una mejor recuperación, realizar un rápido giro del vial antes de la apertura. Disolver el polvo a fondo con una mezcla suave (etiquetada como el tubo de Std1).
3. Rotular 6 tubos de microcentrífuga limpios como Std2 y Std7. Añadir 200 µl de diluyente de muestra a cada uno de los tubos.
4. Pipetear 100 µl Std1 en el tubo Std2 y mezclar suavemente. Realizar 5 más diluciones seriadas mediante la adición de 100 µl Std2 al tubo STD3 y así sucesivamente.
5. Añadir 100 µl de diluyente de muestra a otro tubo etiquetado como CTRL. No añadir citocinas estándar o muestras al tubo CTRL, que será utilizado como control negativo.

Bloqueo e incubación

6. Añadir 100µl del diluyente de muestra en cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos para bloquear las diapositivas.
7. Decantar el tampón de cada pocillo. Añadir 100µl de citocinas estándar o las muestras a cada pocillo. Incubar los arrays a temperatura ambiente durante 1-2 horas.
8. Lavado:
 - Se decantan las muestras de cada pocillo y se lavan 5 veces (5 minutos cada uno) con 150 µl de 1 x Solución de lavado I a temperatura ambiente con agitación suave. Eliminar completamente la solución de lavado en cada paso. Diluir 20 x Solución de lavado I con agua.
 - Se coloca el chip de vidrio con marco en una caja con 1 x Solución de lavado I (cubrir el portaobjetos de vidrio entero y el marco con Solución de lavado I) y lavar a temperatura ambiente con agitación suave durante 20 min.
 - Se decanta la 1 x Solución de lavado I I de cada pocillo, lavar 2 veces

(5 min cada uno) con 150 µl de 1 x Solución de lavado II a temperatura ambiente con agitación suave. Eliminar completamente la solución de lavado en cada paso. Diluir 20 veces la Solución de lavado II con H₂O.

Incubación con el cocktail de detección de anticuerpos y lavado

9. Reconstituir la detección de anticuerpos mediante la adición de 1,4 ml de diluyente de muestra al tubo.
10. Añadir 80 µl de la mezcla de anticuerpos de detección a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente durante 1-2 horas.
11. Decantar las muestras de cada pocillo, y se lava 5 veces con 150 µl de 1 x Solución de lavado I y luego 2 veces con 150 µl de 1 x Solución de lavado II a temperatura ambiente con agitación suave. Eliminar completamente la Solución de lavado en cada etapa de lavado.

Incubación con Cy3 equivalente de colorante de Estreptavidina y lavado

12. Después de un breve giro hacia abajo, agregar 1,4 ml de diluyente de muestra a Cy3 equivalente de colorante conjugado de Estreptavidina. Mezclar suavemente.
13. Añadir 80 µl de Cy3 equivalente colorante conjugado de estreptavidina a cada pocillo. Cubrir el dispositivo con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz o incubar en una habitación oscura. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
14. Decantar las muestras de cada pocillo, se lava 5 veces con 150 µl de 1x Solución de lavado a temperatura ambiente con agitación suave. Quitar completamente la solución de lavado en cada paso.

Detección de fluorescencia

15. Desmontar el dispositivo presionando los clips hacia fuera desde el lado de las diapositivas. Retirar con cuidado el portaobjetos de la junta.
16. Colocar el portaobjetos en la lavadora de diapositivas / secadora (un soporte de 4 diapositivas / tubo centrífuga), añadir una cantidad suficiente 1 x Solución de lavado I (unos 30 ml) para cubrirlo en su totalidad. A continuación, agite suavemente a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se decanta la Solución de lavado I. Lavar con 1 x

tampón de lavado II (unos 30 ml) con cuidado y agite suavemente a temperatura ambiente durante 5 minutos.

17. Eliminar las gotas de agua completamente por una de las siguientes maneras:

- Colocar el chip de vidrio en la lavadora de diapositivas / secadora y secar el cristal del chip por centrifugación a 1.000 rpm durante 3 minutos sin tapa.
- Secar el chip de vidrio por una corriente de N2 comprimido.
- Aplicar succión suavemente con una pipeta para eliminar las gotas de agua. No tocar la matriz, solamente los lados.

18. Imagen: Las señales pueden ser visualizadas mediante el uso de un escáner láser equipado con una longitud de onda Cy3 como Axon GenePix. Cerciorarse de que la señal procedente del pocillo que contiene el más alto nivel de concentración estándar (STD1) recibe la lectura más alta posible.

Análisis de datos

19. La extracción de datos puede hacerse con la mayoría de los software de análisis de microarrays (GenePix, ScanArray Express, ArrayVision o MicroVigene). Se da salida visual, así como valores digitales (fig.13).

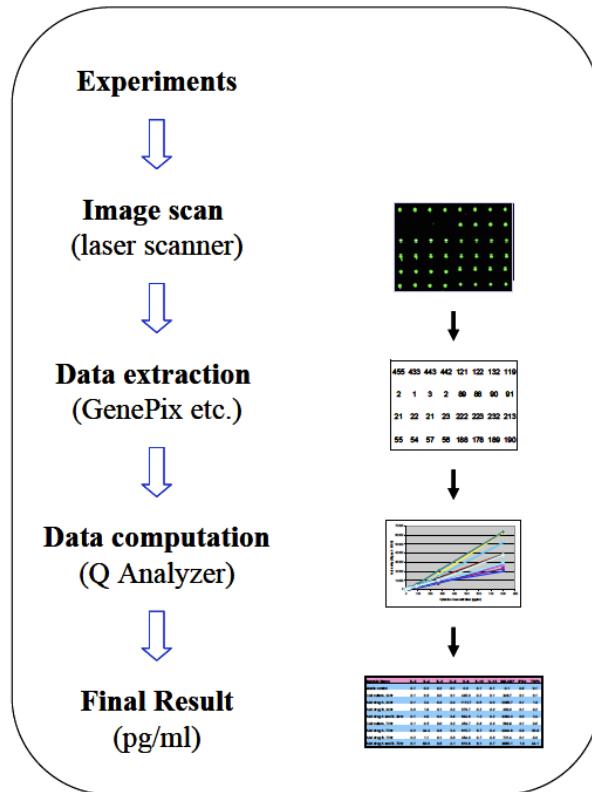


Figura 13: análisis de datos. *Protocolo Quantibody human TH17 array (Raybiotech)*

Mapa de Arrays de Citocinas y curvas estándar (Fig. 14 y 15)

| POS1 | POS2 |
|----------------|----------------|
| GM-CSF | IFN γ |
| IL-1 β | IL-2 |
| IL-4 | IL-5 |
| IL-6 | IL-10 |
| IL-12p70 | IL-13 |
| IL-17 | IL-17F |
| IL-21 | IL-22 |
| IL-23 | IL-28A |
| MIP-3 α | TGF- β 1 |
| TNF α | TNF β |

Figura 14: mapa de citoquinas. *Protocolo Quantibody human TH17 array (Raybiotech)*

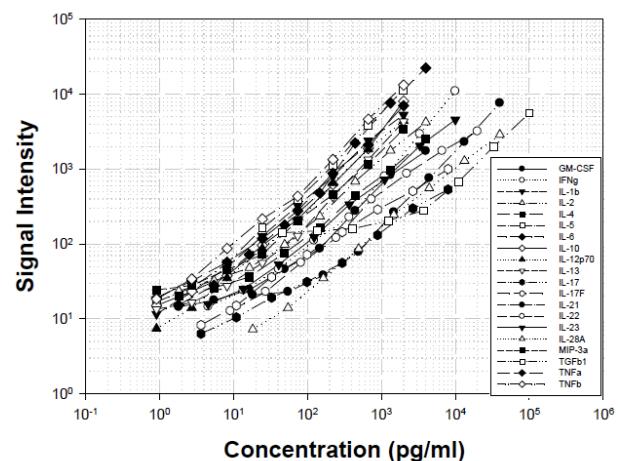


Figura 15: curvas estándar. *Protocolo Quantibody human TH17 array (Raybiotech)*

3.4.4. Quantibody ® Q-Analyzer

Quantibody Q-Analyzer es un array específico, basado en el programa Excel. Sin embargo, no es un simple cálculo macro, sino que contiene un análisis de datos sofisticado.

Características principales:

- Simplicidad: Fácil de manejar y no requiere ninguna formación profesional. Con una copia simple y proceso de pegado, se determina la concentración de citocinas.
- Marcado y eliminación de valores atípicos: El software puede marcar de forma automática y eliminar los puntos atípicos de análisis de datos más precisos.
- Normalización: El programa permite la intra- e inter- normalización para gran número de muestras.
- Dos controles positivos: El programa se lleva a los dos controles positivos en cada array para la normalización.
- Dos algoritmos analíticos: Los usuarios pueden elegir cualquier regresión lineal o log-log algoritmos para satisfacer sus necesidades analíticas.
- Dos salidas de datos: curvas estándar y concentración digital.
- La intervención del usuario: El programa permite el manejo manual por parte del usuario de los valores atípicos y otros datos analíticos.
- Determinación de límites inferior y superior: El programa automáticamente marca los valores por debajo o por encima del rango de detección.
- Desviación Estándar: El programa calcula las desviaciones estándar de la cuaduplicidad de los puntos para dar exactitud a los datos.
- Consejos: Q-Analyzer incluye consejos de análisis en el programa.

4.RESULTADOS

En total, se han recogido 26 pacientes (20 hombres / 6 mujeres), con una media de edad de 66 años (+/-10,33), de los cuales 12 pacientes fueron intervenidos por vía laparoscópica y 14 pacientes fueron intervenidos por vía abierta. Se realizaron un total de 11 Gastrectomías totales + reconstrucción tipo BIII (de las cuales 6 fueron ejecutadas por vía laparoscópica) y 15 Gastrectomías subtotales + 2 reconstrucción BI / 14 reconstrucción BIII (de las cuales fueron intervenidas 6 por vía laparoscópica).

En las siguientes tablas se pueden observar una descripción de la serie de los pacientes incluidos en el estudio, hallazgos clínico-patológicos y resultados postoperatorios.

| | CL (12) | CA (14) | | |
|---------------------------------|---|---------------------------------|---|---------------------------------|
| Sexo (hombre/mujer) | 9:3 | 11:3 | | |
| Edad | 61,33 +/- 11,45 | 70 +/- 7,55 | | |
| BMI | 26,14 +/- 3,67 | 26,75 +/- 4,98 | | |
| Localización | Cardias Cardias-fundus Fundus Cuerpo Antro | 1 1 2 2 6 | Cardias Fundus Cuerpo Cuerpo-antro Antro | 4 2 1 1 6 |
| Sintomatología | Epigastralgia Dispepsia Disfagia Vómitos Síndrome tóxico HDA Anemia | 6 1 2 1 4 3 3 | Epigastralgia Dispepsia Disfagia Vómitos Síndrome tóxico HDA Anemia | 8 2 3 1 7 4 7 |
| Patología asociada | Cardíaca Respiratoria Otras | 0 0 6 | Cardíaca Respiratoria Otras | 4 7 8 |
| Cirugía abdominal previa | Cx gástrica Otras Cx | 1 2 | Cx gástrica Otras Cx | 4 3 |
| Neoplasia previa | No gástrica | 1 | No gástrica | 1 |

Tabla 4: Descriptiva de la serie

| | CL (12) | CA (14) |
|---|------------------|------------------|
| ASA | | |
| II | 6 | 6 |
| III | 5 | 5 |
| IV | 1 | 3 |
| Estadio (pTN) | | |
| Tis | 1 | 1 |
| T1 | 3 | 2 |
| T2 | 2 | 1 |
| T3 | 5 | 4 |
| T4 | 1 | 6 |
| N presente | 4 | 8 |
| N ausente | 8 | 6 |
| Nº de ganglios postop. resecados | 18,41 +/- 10,43 | 20,71 +/- 21,26 |
| Complicaciones | | |
| Médicas | 2 | 2 |
| Quirúrgicas | 5 | 4 |
| Duración IQ | 241,66 +/- 40,47 | 181,07 +/- 54,28 |
| Estancia hospitalaria | 23,5 +/- 19,57 | 13,5 +/- 7,49 |

Tabla 5: Hallazgos clínico-patológicos y postoperatorios

Hasta el momento se han realizado 2 arrays de proteínas en los que hemos evaluado un total de 9 muestras. Se ha puesto a punto la metodología descrita de extracción, cuantificación y el protocolo del array.

En el primer array de las 20 citocinas evaluadas se obtuvieron valores cuantificables de 11 proteínas (INF, IL2, IL5, IL6, IL13, IL21, IL22, IL23, TGF β 1, TNF α y TNF β). De 2 (GM-CSF e IL-10) los valores fueron muy bajos y de 7 (IL-1b, IL-4, IL-12p70, IL-17, IL-17F, IL-28a, MIP-3a) no hubo expresión en el 80% de los casos.

En el segundo array hubo menor expresión, de las 20 citocinas evaluadas se obtuvieron valores cuantificables de 8 proteínas (IL-2, IL-5, IL-6, IL-13, IL-21, IL-22, IL-28A, TNF β). De 9 (GM-CSF, IFN, IL-1b, IL-4, IL-12p70, IL-17, MIP-3a, TGF- β 1, TNF α) no hubo expresión en el 80% de los casos. Y de 3 los valores fueron muy bajos (IL-10, IL-17F, IL-23).

Durante este proceso hemos encontrado las siguientes dificultades: cantidad de RNA insuficiente en algunos casos, para solucionarlo aumentamos la cantidad de tejido para la homogeneización de éste y posterior purificación del RNA de forma manual para aumentar el rendimiento de las columnas de purificación. De esta manera conseguimos tener una concentración óptima de RNA. Por otro lado, algunas muestras presentaban integridad del RNA baja, analizamos muestras extraídas en distintos días para comprobar que la obtención/manipulación fuese responsable de RQI bajos (RQI: RNA quality index, evaluado mediante el bioanalizador Experion que indica la integridad del RNA, imprescindible para la realización de estudios de expresión mediante microarrays ya que el RNA degradado podría dar falsos positivos o falsos negativos. Se considera óptimo a partir de 7). Los RQI bajos podrían estar relacionados con el uso del bisturí eléctrico durante la intervención/extracción del tejido peritoneal, por lo que se realizó a partir de entonces siempre mediante bisturí frío.

Como resultados preliminares hemos interpretado la respuesta del TNF en nuestras muestras. Los niveles basales de TNF en peritoneo al inicio son comparables ($p=NS$; Test de Wilcoxon). Al comparar las variaciones en el tiempo, observamos que en el grupo intervenido por laparoscopia hay un incremento significativo, expresándose más TNF en la CL a la hora (t_0 vs t_1 ; $p < 0,05$; Wilcoxon), cosa que no ocurre en las abiertas ($p = NS$). Si comparamos los incrementos del TNF en la CA vs. CL, tampoco hay diferencias significativas ($p = ns$; test de Mc Nemar). En nuestra muestra, aunque hubo diferencias en los valores finales, en ambos abordajes, el incremento del TNF en respuesta a la agresión quirúrgica es similar.

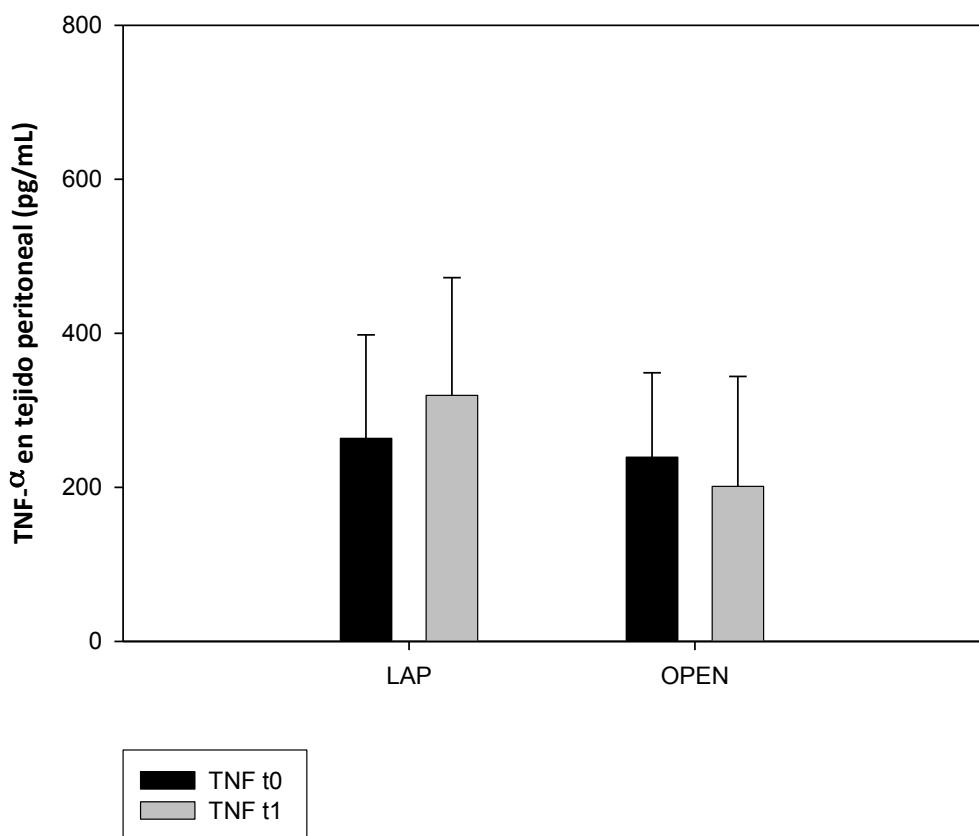


Tabla 6: Valores de TNF en tejido peritoneal CL vs CA.

5.DISCUSIÓN

La gastrectomía asistida por laparoscopia para el tratamiento del cáncer gástrico ha despertado el interés de los cirujanos en la actualidad. Debido a sus ventajas, incluyendo un menor trauma y superior efecto cosmético en comparación con la cirugía abierta convencional, se ha considerado como un procedimiento estándar para el tratamiento del cáncer gástrico.

Dejando a un lado los aspectos meramente técnicos de la cirugía laparoscópica vs. abierta, queremos tratar algunos aspectos de relevancia en la respuesta inmunológica, basándonos en los mecanismos inflamatorios a nivel local (tejido peritoneal).

La polémica por la vía de acceso en la cirugía creó una brecha en la ejecución de los procedimientos quirúrgicos y sus realizadores. Posiciones radicales en ambos sentidos se encuentran publicadas^{104 105 106} pero hoy vemos cambios en la forma de pensar, llegando a un punto más específico, basado en la biología de los tumores, respuesta inmunológica local y sistémica, conciliando ambas posiciones y colocándonos en la actitud de recapacitar y adecuarnos a la mejor opción, basados en los resultados y estudios publicados en la literatura.

La cirugía desencadena respuestas de fase aguda y deprime transitoriamente la función inmunitaria sistémica¹⁰⁷. Además, la preservación de la inmunidad sistémica se asocia con una menor incidencia de complicaciones infecciosas, recurrencias locales y metástasis a distancia¹⁰⁸. La mayoría de los estudios que han comparado la colecistectomía laparoscópica y abierta han concluido que el abordaje laparoscópico atenúa la respuesta de fase aguda¹⁰⁹. Sin embargo, después de grandes cirugías laparoscópicas en enfermedades malignas, las diferencias en la función inmune celular, se hacen menos evidentes.

Los procedimientos de cirugía abdominal mayor producen un cúmulo de efectos reconocidos en el sistema inmune. Estos incluyen la liberación de citocinas, proteínas reactantes de fase aguda y la depleción de la respuesta inmune mediada por células. La vía laparoscópica conlleva además una mejoría en el estado postoperatorio en comparación a la cirugía tradicional con disminución del dolor y menor frecuencia de íleo posquirúrgico¹¹⁰. Si bien no se ha demostrado una diferencia significativa en supervivencia ni recurrencia de los grupos comparativos, en términos oncológicos se abre un nuevo panorama de abordaje al cáncer gástrico que pareciera tener implicaciones positivas en los aspectos inmunológicos.

Un ejemplo y aproximación al interrogante de que la inmunosupresión afecta al pronóstico tumoral y la respuesta sistémica inmunitaria, es la realización de transfusiones en el período cercano a la cirugía o en la cirugía, que causa una marcada depresión de la respuesta mediada por células, lo que trae un deterioro del pronóstico a largo plazo en comparación a los pacientes no transfundidos en el mismo estado de enfermedad¹¹¹.

El impacto de la cirugía en los pacientes con cáncer, en la inhibición del crecimiento de células tumorales liberadas durante el procedimiento y la disminución de la apoptosis (células mononucleares y granulocitos) implica una modificación en la resistencia del huésped a los tumores y otros mecanismos de defensa, durante y después de la cirugía. Se ha demostrado la alteración en el balance entre los factores estimuladores de angiogénesis y las células reguladoras del crecimiento tumoral¹¹². Kirkman utilizó plasma de pacientes llevados a cirugía para resección de colon vs. pacientes llevados a bypass gástrico, con porcentajes iguales de pacientes abiertos y por laparoscopia. Demostró un incremento *in vitro* de factores de crecimiento tumoral en el primer día postoperatorio de muestras de plasma de pacientes llevados a cirugía abierta en comparación con las de los mismos pacientes antes de la cirugía.

Las razones moleculares en que se basan los mecanismos inmunes se expresan en tres respuestas:

1. Respuesta mediada por células

2. Respuesta inflamatoria

3. Respuesta de hipersensibilidad retardada

La hipersensibilidad retardada valorada pre y postoperatoriamente es una de las formas simples de evaluar la actividad de este tipo de respuesta. Muchos de estos ensayos se han realizado en cirugía colorrectal y específicamente en cáncer, pero otros se han desarrollado en estudios de colecistectomía laparoscópica vs. colecistectomía abierta o en procedimientos antirreflujo. El estudio de Allendorf, en 1996, demostró una menor respuesta de hipersensibilidad retardada en pacientes a quienes se les realizó resección de ciego por vía laparoscópica vs. abierta hasta el tercer día postoperatorio cuando esta proporción se igualó^{113 114}.

Existen también un gran número de citocinas liberadas posteriormente a la cirugía o cualquier traumatismo, es el caso de la IL-6 (Interleuquina 6), IL- 8 y la IL-1β. Se encontraron aumentos de estas sustancias en el postoperatorio de cirugía colorrectal abierta en comparación con la cirugía laparoscópica, de significancia en las primeras 24 horas^{115 116}.

Finalmente, la respuesta mediada por células ha sido más extensamente estudiada en estos casos e incluye una serie de interacciones que condensan los tipos de respuesta inmune ya descritos. Los linfocitos T y las células asesinas (Natural Killer) se han encontrado en niveles bajos como respuesta al trauma. Pero la identificación colateral de estas células a través de los niveles de IFN-γ y de la IL-4 encontraron alteraciones importantes en el radio de identificación Th1/Th2 entre laparoscopia y colectomía abierta, predominando la Th2 en la primera, con implicación en la respuesta asociada a linfocitos B, así como también el predominio de la relación entre CD4 y CD8 con preponderancia de las células ayudadoras en los pacientes llevados a cirugía laparoscópica vs. abierta. Otros estudios in vitro de la función de macrófagos y monocitos están en relación con la insuflación del neumoperitoneo con CO₂ inhibiendo la función de los macrófagos. También la disminución en la expresión del HLA-DR en los pacientes abiertos para colectomía favoreciendo a los pacientes intervenidos por laparoscopia en el cuarto día postoperatorio¹¹⁷.

La CL para ser aceptada como abordaje de elección en el tratamiento de enfermedades malignas, debe garantizar la perfección quirúrgica , al igual que los métodos abiertos son capaces de proporcionar seguridad, tanto en bases fisiológicas, como en términos de prevención de la diseminación del tumor y recurrencia. Algunos estudios en modelos animales han concluido que por vía laparoscópica la cirugía presenta un mayor riesgo de metástasis hepáticas y de crecimiento tumoral¹¹⁸, mientras que otros han concluido lo contrario¹¹⁹. En cuanto a enfermedades malignas de colon y cáncer renal, varios estudios concluyen que no hay diferencias entre las integridades de la inmunidad peritoneal y sistémica después del trauma quirúrgico, entre el enfoque abierto y laparoscópico^{120 121 122}. Sin embargo, Fujii et al.¹²³ y Balli et al.¹²⁴ obtuvo más resultados favorables para los grupos laparoscópicos en cuanto al mantenimiento de la inmunidad peritoneal y sistémica después de la cirugía. Sin embargo, sus estudios revelaron una diferencia notable entre la CL y CA en relación al estadio TNM, la tasa de complicaciones, y la transfusión, que tienen muchas probabilidades de afectar a la inmunidad del huésped.

En lo referente al cáncer gástrico, desde que Kitano describió por primera vez la CL para el cáncer gástrico a principios de 1994¹²⁵, muchos informes han apoyado sus resultados en muchos aspectos^{126 127}. Adachi et al¹²⁷ destacó las ventajas de la laparoscopia en cuanto a la reducción de las reacciones de fase aguda, la minimización de la lesión del tejido, y la supresión de la función inmune. Sin embargo, su estudio carecía de suficientes datos objetivos de laboratorio y presentaba demasiados parámetros quirúrgicos. Por otra parte, se han realizado muy pocos estudios sobre las reacciones inmunológicas e inflamatorias después de gastrectomía radical y la cirugía combinada con linfadenectomía extensa. Un estudio¹²⁸ demostró que la PCR se incrementa en un menor grado ($P = 0,03$) en CL en cáncer gástrico, lo que indica que la CL causa menos daño en los tejidos que la cirugía abierta. Además analizaron la proteína SAA, un precursor en el suero, que se deposita en el tejido de la amiloidosis secundaria y en enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la tuberculosis o la enfermedad reumática crónica¹²⁹. SAA es sintetizada en el hígado en presencia de una reacción inflamatoria aguda y es liberada al suero a un nivel notable en comparación con la PCR. Los niveles de SAA en CL

fueron significativamente más bajos ($P = 0,01$) que en CA, lo que apoya la idea de que la lesión del tejido y la respuesta inflamatoria aguda después CL ocurre a un menor grado que después de CA.

Otros estudios recientes han identificado que las citocinas producidas durante la cirugía influyen en la recurrencia del tumor *in vitro*¹³⁰. La concentración de IL-1 β y TNF- α , que juegan un papel importante en la respuesta mesotelial en la lesión peritoneal, aumentan significativamente en el líquido peritoneal postoperatorio. Esto crea un microambiente rico en concentraciones de citocinas y factores de crecimiento el peritoneo traumatizado. En este estudio *in vitro*, se demuestra que la preincubación de las células mesoteliales con las citoquinas IL-1 β y TNF- α incrementan significativamente la adhesión de SGC-7901 y MKN-45 en el carcinoma gástrico con las células mesoteliales. Este fenómeno también se observó en las células tumorales de ovario¹³¹. El mecanismo exacto de cómo los factores inflamatorios promueven la adhesión de las células de cáncer gástrico a las células mesoteliales es todavía desconocida. Los resultados de inmunohistoquímica en el cáncer gástrico humano y muestras de tejido peritoneal fueron también convincentes con respecto a la expresión de moléculas de adhesión.

Ge Yu et al¹³² estudiaron también las diferencias del trauma quirúrgico en CL vs. CA. La agresión quirúrgica estimuló la liberación de una gran variedad de citocinas. Las citocinas son producidas en el sitio de la lesión como mediadores de la respuesta del huésped a la lesión quirúrgica. IL-1 β y TNF- α son los principales reguladores de la respuesta mediada por citocinas, y sus niveles han demostrado que se correlacionan con la severidad de la agresión quirúrgica. El efecto de la CL y la CA sobre la secreción de citocinas intraperitoneales inflamatorias locales y sistémicas (IL-1 β y TNF- α) también se investigó. La IL-1 β presenta una mayor concentración a las pocas horas de la cirugía y alcanzó su punto máximo a las 24 h, con niveles de más del doble en CA respecto a CL. Puede ser que la respuesta inflamatoria y la respuesta de células de fase aguda sean mayores después de la cirugía convencional que con la laparoscopia. Curiosamente, en ambos grupos, los niveles de IL-1 β en el

drenaje peritoneal fueron aproximadamente 100 veces mayor que los niveles séricos. Esto apoya la idea de que la IL-1 β se genera localmente y es compartimentada en respuesta a un trauma, que está en acuerdo con otros estudios^{133 134}. TNF- α es un potente inductor de la producción de IL-1 β y es responsable de las manifestaciones sistémicas como son fiebre, taquicardia, aumento de catabolismo, y la hipotensión. El TNF- α es uno de los primeros mediadores que aparece después de la lesión quirúrgica y tiene una vida media de menos de 20 min. En este estudio, la liberación de TNF- α aumentó rápidamente cuando comenzó la operación, alcanzó el nivel más alto en 4 horas, y luego disminuyó gradualmente. Por lo tanto, la secreción de TNF- α no es coherente con la IL-1 β perioperatoriamente en ambos grupos. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ambos. Estos resultados son consistentes con los reportados por Leung y colaboradores¹³³, que demostraron que no había diferencia en las respuestas locales y sistémicas de concentración de TNF- α después de la colectomía laparoscópica y abierta en recto y colon sigmoide. Por lo tanto, tal estudio demuestra que los factores inflamatorios, tales como la IL-1 β y TNF- α , tienen un efecto positivo sobre la adherencia de las células de cáncer gástrico a las células mesoteliales peritoneales por aumento de la expresión de moléculas de adhesión. Por tanto, es posible que el trauma quirúrgico sea uno de los principales factores que influyen en la recidiva local y metástasis peritoneal después de un abordaje quirúrgico. Como resultado, el impacto de laparoscopia en la región abdominal, en el postoperatorio y en la respuesta inmune sistémica es menor que la observada con el abordaje convencional. Así, se concluye que CL es una técnica que tiene ventajas clínicamente relevantes, y también genera menos factores proinflamatorios que en la CA, que puedan promover la recurrencia local y metástasis peritoneales del cáncer gástrico.

En nuestro estudio, mediante el análisis de la respuesta inflamatoria peritoneal pretendemos llegar a resultados similares a los de los estudios publicados hasta la fecha y valorar si esta respuesta local es menor en la vía laparoscópica en comparación con la vía abierta en el cáncer gástrico. Además nos planteamos investigar mediante la tecnología de los arrays de proteínas si se presenta alguna nueva respuesta o línea inflamatoria diferente,

dependiendo de la vía de abordaje y la correlación de esta respuesta inmune con los parámetros clínicos presentados en cada caso.

Tal vez en el futuro, la medida necesaria para llevar estos pacientes a cirugía será optimizar la inmunidad tan afectada en esos estados y probablemente el procedimiento menos invasivo sea la opción laparoscópica, más efectiva en este aspecto. La CL para cáncer gástrico se visualiza como un factor muy importante y dependiente en la preservación de esa inmunidad.

6.CONCLUSIONES

Durante este periodo se ha realizado el análisis intermedio de los resultados clínicos de la aplicación del programa de CL del cáncer gástrico frente a la CA. La resección de las neoplasias gástricas así como las linfadenectomías asociadas se pudieron realizar de manera segura por vía laparoscópica con una morbimortalidad similar a la de la cirugía convencional si bien el dolor postoperatorio fue menor y la recuperación precoz.

En lo referente a los resultados inmunológicos (ver apartado resultados) todavía estamos pendientes de resultados definitivos, pero basándonos en los resultados preliminares, en la literatura publicada hasta la fecha, y dada la moderna tecnología del análisis mediante arrays de proteínas, creemos que es posible llegar a obtener conclusiones estadísticamente significativas que apoyen nuestra hipótesis acerca de una menor respuesta inflamatoria local en el abordaje laparoscópico en el cáncer gástrico y su correlación con datos clínicos y pronósticos.

BIBLIOGRAFÍA

1

R, L. N. (1991). Gastroenterología. Principios Básicos y Pruebas Diagnósticas. Ciudad de la Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1991.

² R, B. K. (1991). Atlas en Colores de Laparoscopia 3er. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.

³ RB., H. (1954). Peritoneoscopy as a diagnostic adjunct in Gastroenterology. (A. J. Gastroenterol, Ed.) 22(3): 221-30

⁴ Bender JS, D. M. (2002). Increases laparoscopic experience does not lead to improved results with acute Cholecystitis. Am J Surg , 184(6):591-4.

⁵ Cowan GS, J. B. (1998). Significant changes in blood pressure, glucose, ang lipids with gastric bypass surgery. World J Surg , 22(9):987-92.

⁶ Sugerman HJ, K. J. (1992). Gastric bypass for treating severe obesity. Am J Clin Nutr, 55(2suppl):560S-66S.

⁷ AC., W. (1994). Laparoscopic gastric bypass, Roux en-Y: preliminary report of five cases. Obes Surg , 4:353-357.

⁸ Schauer P, I. S. (2003). The learning curve for laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass is 100 cases. Surg Endosc , 17(2):212-5.

⁹ Oliak D, B. G. (2003). Laoaroscopic Roux-en-Y gastric bypass: defining the learning curve. Surg Endodc , 17(3):405-8.

¹⁰ Lujan JA, F. M. (2004). Laparoscopic versus open gastric bypass in the treatment of morbid obesity: a randomized prospective study. Ann Surg , 239(4):433-7.

¹¹ Courcoulas A, P. Y. (2003). Comparing the outcomes after laparoscopic versus open gastric bypass: a matched paired analysis. Obes Surg , 13(3):341-6.

¹² Benaiges D, F.-L.-R. J.-B. (2012). Impact of Restrictive (Sleeve Gastrectomy) vs Hybrid Bariatric Surgery (Roux-e-Y Gastric Bypass) on Lipd Profile. Obes Surg , Apr 29.

¹³ Helmiö M, V. M. (2012). A randomized prospective multicenter study comparing laparoscopic sleeve gastrectomy and gastric bypass in the treatment of morbid obesity: preliminary results. Endosc Surg , Abril5.

¹⁴ Peterli R, S. R.-C. (2012). Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. Obes Surg , 22(5):740-8.

¹⁵ Ramón JM, S. S. (2012). Gastrointest Surg. 16(6):1116-22.

¹⁶ Lacy AM, G.-V. J. (2002). Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treament of non-metastaic colon cancer: a randomised trial. Lancet , 359(9325):2224-9.

-
- ¹⁷ Marcello PW, M. J. (2000). Laparoscopic restorative proctocolectomy: case-matched comparative study with open restorative proctocolectomy. *Colon Rectum* , 43(5):604-8.
- ¹⁸ Alves A, P. Y. (2005). French multicentre prospective observational study of laparoscopic versus open colectomy for sigmoid diverticular disease. *Br J Surg* , 92(12):1520-5.
- ¹⁹ Rose J, S. C. (2004). Complications in laparoscopic colorectal surgery: results of a multicentre trial. *Tech Coloproctol* , 8 Suppl 1:s25-8.
- ²⁰ Gelpi JR, D.-T. K. (1996). Prospective comparison of gastric emptying after laparoscopic-aided colectomy versus open colectomy. *Am Surg* , 62(7):594-6.
- ²¹ Regenet N, P. P. (2005). Prospective evaluation of the quality of laparoscopic sigmoid resection for diverticular disease. *Hepatogastroenterology* , 52(65):1427-31.
- ²² K., S. (1983). Endoscopic appendectomy. *Endoscopy* , 15:59-64.
- ²³ Ball CG, K. J. (2004). Laparoscopic appendectomy for complicated appendicitis: an evaluation of postoperative factors. *Surg Endosc* , 18(6):969-73.
- ²⁴ Towfigh S, C. F. (2006). Laparoscopic appendectomy significantly reduces length of stay for perforated appendicitis. *Surg Endosc* , 20(3):495-9.
- ²⁵ Cuschieri SA, J. J. (1998). Laparoscopic infracolic approach for complications of acute pancreatitis. *Semin Laparosc Surg* , 5(3):189-94.
- ²⁶ Jaroszewski DE, S. R. (2004). Laparoscopic localization and resection of insulinomas. *Arch Surg* , 139(3):270-4.
- ²⁷ Pietrabissa A, M. C. (2004). Laparoscopic distal pancreatectomy: are we ready for a standardized technique? . *Semin Laparosc Surg* , 11(3):179-83.
- ²⁸ Katkhouda N, H. M. (1999). Laparoscopic management of benign solid and cystic lesions of the liver. *Ann Surg* , 229(4):460-6.
- ²⁹ Lesurtel M, D. N. (2006). Palliative surgery for unresectable pancreatic and periampullary cancer: a reappraisal. *J Gastrointest Surg* , 10(2):286-91.
- ³⁰ Laurent A, C. D. (2003). Laparoscopic liver resection for subcapsular hepatocellular carcinoma complicating chronic liver disease. *Arch Surg* , 138(7):763-9.
- ³¹ Rau HG, B. E. (1998). Laparoscopic liver resection compared with conventional partial hepatectomy. A prospective analysis. *Hepatogastroenterology* , 45(24):2333-8.
- ³² Shimada M, H. M. (2001). Laparoscopic hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Surg Endosc* , 15(6):541-4.
- ³³ Farges O, J. P. (2002). Prospective assessment of the safety and benefit of laparoscopic liver resections . *J Hepatobiliary Pancreat Surg* , 9(2):242-8.
- ³⁴ Milson JW, B. B. (1998). A prospective, randomized trial comparing laparoscopic versus conventional techniques in colorectal cancer surgery: a preliminary report. . *J Am Coll Surg* , 187(1): 46-54.

-
- ³⁵ Berends FJ, K. G. (1994). Subcutaneous metastases after laparoscopic colectomy . Lancet , 344(8914):58.
- ³⁶ Vukasin P, O. A. (1996). Wound recurrence following laoaroscopic colon cancer resection. Results of the American Society of Colon an Rectal Surgeons Laparoscopic Registry. Dis Colon Rectum , 39(10 Suppl):S20-3.
- ³⁷ Lacy AM, D. S.-V. (1998). Port site metastases and recurrence after laparoscopic colectomy. A randomized trial. Surg Endosc , 12(8):1039-42.
- ³⁸ Hashizume M, T. K. (1995). Laparoscopic hepatic resection for hepatocellular carcinoma. Surg Endosc , 9(12):1289-91.
- ³⁹ Reich H, M. F. (1991). Laparoscopic excisión of benign liver lesions. . Obstet Gynecol , 78(5 Pt 2):956-8.
- ⁴⁰ Soulez G, G. M. (1004). Malignant biliary obstruction; preliminary results of palliative treatment with hepaticogastrostomy under fluoroscopic, endoscopic, and laparoscopic guidance. Radiology , 192(1):241-6.
- ⁴¹ Dulucq JL, W. P. (2005). Are major laparoscopic pancreatic resections worthwhile? A prospective study of 32 patients in a single institution. Surg Endosc , 19(8):1028-34.
- ⁴² Goh P, T. Y. (1992). The technique of laparoscopic Billroth II gastrectomy. Surg Laparosc Endosc , 2(3):258-60.
- ⁴³ Kitano S, I. Y. (1994). Laparoscopy-assisted Billroth I gastrectomy. Surg Laparosc Endosc , 4(2):146-8.
- ⁴⁴ Asensio F, A. J. (1997). Video-laparoscopic staging of gastric cancer. A prospective multicenter comparison with noninvasive techniques. Surg Endosc , 11(12):1153-8.
- ⁴⁵ Burke EC, K. M. (1997). Laparoscopy in the management of gastric adenocarcinoma. Ann Surg , 225(3):262-7.
- ⁴⁶ Matthews BD, W. R. (2002). Laparoscopic vs open resection of gastric stromal tumors. Surg Endosc , 16(5):803-7
- ⁴⁷ Shinsuke. (2003). Hand-Assisted Laparoscopic Total gastrectomy for Early Gastric Cancer . Surg Laparosc Endosc Percutan Tech , 13(5):304-307.
- ⁴⁸ S., K. (1995). Laparoscopic approaches in the management of patients with early gastric carcinomas. Surg Laparosc Endosc , 5:359-362.
- ⁴⁹ M., O. (1994). Laparoscopic wedge ressection of the stomach for early gastric cancer using a lesion-lifting method. Dig Surg , 11:64-67.
- ⁵⁰ Kitano S, S. N. (2002). A randomizez controlled trial comparing open vs laparoscopu-assisted distal gastrectomy for the treatment of early gastric cancer: an interim report. Surgery , 131(1Suppl):S306-11.

-
- ⁵¹ Lee JH, H. H. (2005). A prospective randomized study comparing open vs laparoscopy-assisted distal gastrectomy in early gastric cancer: early results. . Surg Endosc , 19(2):168-73.
- ⁵² Rocco A, N. G. (2007). Diet, H Pylori infection and gastric cancer: evidence and controversies. . World J Gastroenterol , 13(21):2901-2912.
- ⁵³ De Koster E, B. M. (1994). Helicobacter pylori: the link with gastric cancer. . Eur J Cancer Prev , 3(3):247-57.
- ⁵⁴ Zhang C, Y. N. (2005). Helicobacter pylori infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. World J Gastroenterol , 11(6):791-6.
- ⁵⁵ Bakir T, C. G. (2000). Stomach cancer history in the siblings of patients with gastric carcinoma. Eur J Cancer Prev , 9(6):401-8.
- ⁵⁶ W., W. (1960). Development in the treatment of cancer of the stomach at the Mayo Clinic since 1907. Arch Surg , 80:1043-7.
- ⁵⁷ Rush BF, J. B. (1960). Total gastrectomy: an evaluation of its use in the treatment of gastric cancer. Cancer , 13:643-8.
- ⁵⁸ Maruyama K, O. K. (1987). Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. World j Surg , 11(4):418-25.
- ⁵⁹ HUGTiP, Comité de tumores (2010). Protocolo de actuación en el paciente con Neoplasia de estómago. Badalona: HUGTiP; 3-9.
- ⁶⁰ HUGTiP, Comité de tumores (2010). Protocolo de actuación en el paciente con Neoplasia de estómago. Badalona: HUGTiP; 10-18.
- ⁶¹ Annie On On Chan, B. C. (s.f.). <http://www.uptodate.com> . Obtenido de Epidemiology of gastric cancer.: Walthman (MA):Uptodate 2005.
- ⁶² R Morales Chamorro, M. M. (2005). Cáncer de estómago. Medicine , 9(25):1613-1620.
- ⁶³ Vincent T DeVita Jr, S. H. (2005). Cancer of stomach. En K. D. Pisters PW, Principles and Practice of Oncology. 7^a th ed (págs. 909-944). Philadelphia: Lippincott William and Wilkins.
- ⁶⁴ Gunderson LL, D. J. (2005). Cáncer gástrico. En Oncología clínica. 3^a ed. (págs. 1819-1863). Madrid: Editorial Elsevier.
- ⁶⁵ Dennis A Cascciatto, B. B. (2001). Tumores del tracto gastrointestinal. En G. RM., Oncología clínica. 4^a ed. (págs. 177-182). Madrid: Marban.
- ⁶⁶ Franceschi S, L. F. (1994). Comparison of cancer mortality trends in major European areas 1960-1989. Eur J Cancer Prev. , 3:145-206.
- ⁶⁷ Japanese Research Society for Gastric Cancer. The general rules for the gastric cancer study in surgery and pathology. . 12th ed. Tokyo: Kanahara Shuppan 1993.

-
- ⁶⁸ Cozzaglio L, Doci R, Celotti S, Roncalli M, Gennari L. Gastric cancer: extent of lymph node dissection and requirements for a correct staging. *Tumori* 2004;90(5):467-72.
- ⁶⁹ Brennan MF. Lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* 1999;340(12):956-8.
- ⁷⁰ Siewert JR, Bottcher K, Roder JD, Busch R, Hermanek P, Meyer HJ. Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. German Gastric Carcinoma Study Group. *Br J Surg* 1993;80(8):1015-8.
- ⁷¹ Bouvier AM, Haas O, Piard F, Roignot P, Bonithon-Kopp C, Faivre J. How many nodes must be examined to accurately stage gastric carcinomas? Results from a population based study. *Cancer* 2002;94(11):2862-6.
- ⁷² P., M. (1995). D1 versus D2 dissection for gastric cancer. *Lancet*, 345(8963):1516-8.
- ⁷³ OnoH, K. H. (2001). Endoscopic mucosal resection for treatment of early gastric cancer. *Gut* , 48(2):225-9.
- ⁷⁴ Roukos D, S.-M. A. (1995). Adenocarcinoma of the gasric antrum: does D2 total gastrectomy with splenectomy improve prognosis compared to D1 subtotal gastrectomy? A long-term survival analysis with emphasis on Lauren classification. *Surg oncol* , 4(6):323-32.
- ⁷⁵ Bozzetti F, M. E. (1999). Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg* , 230(2):170-8.
- ⁷⁶ Robertson CS, C. S. (1994). A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg* , 220(2):176-82.
- ⁷⁷ Siewert JR, B. K. (1993). Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma. Gernan Gastric Carcinoma Study Group. *Br J Surg* , 80(8):1015-8.
- ⁷⁸ DH., R. (1999). Current advances and changes in treatment strategy may improve survival and quality of life in patients with potentially curable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* , 6(1):46-56.
- ⁷⁹ Maruyama K, G. O. (1989). Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients. *Ann Surg* , 210(5):596-602.
- ⁸⁰ Maehara Y, M. S. (1991). Splenectomy does not correlate with length of survival in patients undergoing curative total gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses. *Cancer* , 67(12):3006-9.
- ⁸¹ Lee KY, N. S. (2001). Impact of splenectomy for lymph node dissection on long-term surgical outcome in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* , 8(5):402-6.
- ⁸² Brady MS, R. A. (1991). Effect of splenectomy on morbidity and survival following curative gastrectomy for carcinoma. *Arch Surg* , 126(3):359-64.
- ⁸³ Otsuji E, Y. T. (1996). End results of simultaneous splenectomy in patients undergoing total gastrectomy for gastric carcinoma. *Surgery* , 120(1):40-4.

-
- ⁸⁴ Viste A, H. T. (1988). Postoperative complications and mortality after surgery for gastric cancer. Ann Surg , 207(1):7-13.
- ⁸⁵ Maruyama K, S. M. (1995). Pancreas-preserving total gastrectomy for proximal gastric cancer. World J Surg , 19(4):532-6.
- ⁸⁶ Parrilla P, Martinez de Haro L, Ortiz A. Guía Esofagogastrica de la Asociación Española de Cirugía. 2001. Cap 35.
- ⁸⁷ Beauchamp RD, Evers BM, Lattox KL, Tratado de cirugía Sabiston, fundamentos quirúrgicos de la práctica quirúrgica moderna, 17^a edición; Elsevier, 2005. Cap 4 45-46.
- ⁸⁸ Lennard TWJ, Shenton BK, Borzotta A, Donnelly PK, White M, Gerrie LM et al. The influence of surgical operations on components of the human immune system. Br J Surg 1985; 72: 771-776.
- ⁸⁹ Targarona EM, Pons MJ, Balagué C, Espert JJ, Moral A, Martínez J et al. Acute phase: only significantly reduced component of the injury response after laparoscopic cholecystectomy. World J Surg 1996, 20: 528-534.
- ⁹⁰ Vittimberga FJ, Foley DP, Meyers WC, Callery MP. Laparoscopic surgery and the systemic immune response. Ann Surg 1998; 227: 326-334.
- ⁹¹ Hackman DJ, Rotstein OD. Host response to laparoscopic surgery: mechanisms and clinical correlates. Can J Surg 1998; 41: 103-111.
- ⁹² Carey PD, Wakefield CH, Thayeb A, Monson JR, Darzi A, Guillou PJ. Effects of minimally invasive surgery on hypochlorous acid production by neutrophils. Br J Surg 1994; 81: 557-560.
- ⁹³ Gal L, Lanios L, Roth E Changes in PMN-elastase and C-Reactive protein following traditional and laparoscopic cholecystectomy. Surg Endosc 1996; 10: 552.
- ⁹⁴ Redmond HP, Watson RWG, Houghton T, Condon C, Watson RGK, Bouchier-Hayes D. Immune function in patients undergoing open vs laparoscopic cholecystectomy. Arch Surg 1994; 129: 1240-1246.
- ⁹⁵ Schaeff B, Paloucci V, Henze A, Encke A. Electron microscopical changes to pneumoperitoneum after laparoscopic explorations. Surg Endosc 1998; 12: 484.
- ⁹⁶ Bloechle C, Kluth D, Emmermann A, Zornig C, Broelsch CE. A pneumoperitoneum perpetuates severe damage to the ultrastructural integrity of parietal peritoneum in gastric perforation-induced in rats. Surg Endosc 1998; 12: 476.
- ⁹⁷ West MA, Baker J, Bellingham J. Kinetics of decreased LPS stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO₂. J Surg Res 1996; 63: 269-274.
- ⁹⁸ West MA, Hackam DJ, Baker J, Rodríguez JL, Bellingham J, Rotstein GD. Mechanism of decreased in vitro macrophage cytokine release following exposure to CO₂: relevance to laparoscopic surgery. Ann Surg 1997; 226: 179-190.

-
- ⁹⁹ Wunsch A, Kuntz C, Bay F, Hansch M, Glaser, Herfarth C. Differences in T-cell activation in laparoscopic versus conventional colon resections in the rat. *Langebecks Arch Chir* 1997; 114: 267-270.
- ¹⁰⁰ Iwanaka T, Arkovitz MS, Arya G, Ziegler. MM Evaluation of operative stress and peritoneal macrophage function in minimally invasive operations. *J Am Coll Surg* 1997; 184: 357-363.
- ¹⁰¹ Jacobi CA, Ordermann J, Zieren HU, Volk T, Halle E, Vokl HD et al. The impact of laparoscopy with CO₂ versus helium on local and systemic inflammation in an animal model of peritonitis. *Surg Endosc* 1998; 12; 480.
- ¹⁰² Evrard S, Falkenrodt A, Park A, Tassetti V, Mutter D, Marescaux J. Influence of CO₂ pneumoperitoneum on systemic and peritoneal cell-mediated immunity. *World J Surg* 1997; 21: 353-357.
- ¹⁰³ Watson RWG, Redmond HP, McCarthy J, Burke PE, Bouchier-Hayes D. Exposure of the peritoneal cavity to air regulates early inflammatory responses to surgery in a murine model. *Br J Surg* 1995; 82: 1060-1065.
- ¹⁰⁴ Cera SM, Wexner SD. Minimally invasive treatment of colon cancer. Department of Colorectal Surgery, Cleveland Clinic Florida. *Cancer J* 2005; 11(1): 26-35.
- ¹⁰⁵ Paraskeva PA, Aziz O, Darzi A. Laparoscopic surgery for colon cancer. Department of Surgical Oncology and Technology, Imperial College London. *Surg Clin North Am* 2005; 85(1): 49-60.
- ¹⁰⁶ Davies MM, Larson DW. Laparoscopic surgery for colorectal cancer: the state of the art. Division of Colon and Rectal Surgery Mayo Clinic and Mayo Foundation. *Surg Oncol* 2004; 13(2-3): 111-8.
- ¹⁰⁷ Ni Choileain N, Redmond HP: Cell response to surgery. *Arch Surg* 2006;141:1132–1140.
- ¹⁰⁸ Carter JJ, Whelan RL: The immunologic consequences of laparoscopy in oncology. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10:655–677.
- ¹⁰⁹ Sheen-Chen SM, Chen HS, Eng HL, et al.: Systemic immune response after laparoscopic and open cholecystectomy. *World J Surg* 2002;26:1418–1422.
- ¹¹⁰ Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of Laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *N England Journal of Medicine* 2004; 350(20): 2050-9.
- ¹¹¹ DeVita V, Hellman S and Rosenberg S. *Cancer: Principles and Practices of Oncology*. 7 ed. Lippincott.
- ¹¹² Kirkman I, Cekic V, Poltaratskaia N, Asi Z, Bessler M, Whelan RL. Plasma from patients undergoing major open surgery stimulates *in vitro* tumor growth; lower IGF-BP3 levels may, in part, account for this change. *Surgery* 2002; 132: 186-92.
- ¹¹³ Allendorf JD, Bessler M, Whelan RL. Better preservation of immune function after laparoscopic-assisted versus open bowel resection in a murine model. *Diseases of colon and Rectum* 1996; 39: 67-72.

-
- ¹¹⁴ Whelan RL, Franklin M, Holubar SD. Postoperative cell mediated immune response is better preserved after laparoscopy than laparotomy. *Surgical Endoscopy* 2003; 17(6): 972-8.
- ¹¹⁵ Leung KL, Lai PB, Ho RL. Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: a prospective randomized trial. *Annals of Surgery* 2000; 231(4): 506-11.
- ¹¹⁶ Wu FP, Sietses C, Von Blomberg BM. Systemic and peritoneal inflammatory response after laparoscopic or conventional colon resection in cancer patients. *Diseases of Colon and Rectum* 2003; 46(2): 147-55.
- ¹¹⁷ Patricia Sylla, Kirkman Irena, Whelan RL. Immunological advantages of advanced laparoscopy. *Surgical Clinics of North America* 2005; 85: 1-18.
- ¹¹⁸ Gutt CN, Gessmann T, Schemmer P, et al.: The impact of carbón dioxide and helium insufflation on experimental liver metastases, macrophages, and cell adhesion molecules. *Surg Endosc* 2003;17: 1628–1631.
- ¹¹⁹ Carter JJ, Whelan RL: The immunologic consequences of laparoscopy in oncology. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10:655– 677.
- ¹²⁰ Tang CL, Eu KW, Tai BC, et al.: Randomized clinical trial of the effect of open versus laparoscopically assisted colectomy on systemic immunity in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2001;88:801–807.
- ¹²¹ Whelan RL, Franklin M, Holubar SD, et al.: Postoperative cell mediated immune response is better preserved after laparoscopic vs open colorectal resection in humans. *Surg Endosc* 2003; 17:972–978.
- ¹²² Landman J, Olweny E, Sundaram CP, et al.: Prospective comparison of the immunological and stress response following laparoscopic and open surgery for localized renal cell carcinoma. *J Urol* 2004;171:1456–1460.
- ¹²³ Fujii K, Izumi K, Sonoda K, et al.: Less impaired cell-mediated immune response in the murine peritoneal cavity after CO₂ pneumoperitoneum. *Surg Today* 2003;33:833–838.
- ¹²⁴ Balli JE, Glass J, Gonzalez JJ, et al.: Postoperative cell mediated immune response is better preserved after laparoscopic vs open colorectal resection in humans. *Surg Endosc* 2003;17:972–978.
- ¹²⁵ Kitano S, Shiraishi N, Uyama I, et al.: Japanese Laparoscopic Surgery Study Group. A multicenter study on oncologic outcome of laparoscopic gastrectomy for early cancer in Japan. *Ann Surg* 2007;245:68–72.
- ¹²⁶ Shimizu S, Uchiyama A, Mizumoto K, et al.: Laparoscopically assisted distal gastrectomy for early gastric cancer: Is it superior to open surgery? *Surg Endosc* 2000;14:27–31.
- ¹²⁷ Adachi Y, Shiraishi N, Shiromizu A, et al.: Laparoscopy-assisted Billroth I gastrectomy compared with conventional open gastrectomy. *Arch Surg* 2000;135:806–810.

-
- ¹²⁸ Il-Kwon Jung, Min-Chan Kim, Kyeong-Hee Kim, Jong-Young Kwak, Ghap-Joong Jung. Cellular and Peritoneal Immune Response After Radical Laparoscopy Assisted and Open Gastrectomy for Gastric Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2008;98:54–59
- ¹²⁹ Malle E, De Beer FC: Human serum amyloid A (SAA) protein: A prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest* 1996;26:427–435.
- ¹³⁰ Yamada T: Serum amyloid A (SAA): A concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:381–388.
- ¹³¹ Hunter JG: Minimally invasive surgery. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, editors. *Principles of Surgery*. New York: McGraw-Hill Co., Inc; 1999. 2145.
- ¹³² Ge Yu, Bo Tang, Pei-Wu Yu, Zhi-hong Peng, Feng Qian, Gang Sun. Systemic and peritoneal inflammatory response after laparoscopic-assisted gastrectomy and the effect of inflammatory cytokines on adhesion of gastric cancer cells to peritoneal mesothelial cells. *Surg Endosc* (2010) 24:2860–2870.
- ¹³³ Leung KL, Lai PB, Ho RL, Meng WC, Yiu RY et al (2000) Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann Surg* 231:506–511.
- ¹³⁴ Glaser F, Sannwald GA, Buhr HJ, Mayer H, Herfarth C (1995) General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg* 221:372–380.