



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia

***INFECCIÓN PERITONEAL POSTOPERATORIA Y
RECURRENCIA DEL CÁNCER COLORRECTAL:
ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS INFLAMATORIA Y
ANGIOGÉNICA COMO MECANISMOS RESPONSABLES
DE ESTA ASOCIACIÓN***

SANDRA ALONSO GONÇALVES

Barcelona 2013

Directores:

Dr. Miguel Pera

Profesor Asociado, Departamento de Cirugía, Universitat Autònoma de Barcelona
Jefe de Sección de Cirugía Colorrectal, Servicio de Cirugía General, Hospital del Mar,
Barcelona.

Coordinador del Grupo de Investigación en Cáncer Colorrectal, IMIM (Institut Hospital del Mar
d'Investigacions Mèdiques)

Dr. Luis Grande

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

A tu Josep Ma pel teu suport, paciència i amor incondicional. ES.

A tu Laia, la nostra vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Pera, por su gran experiencia, profesionalidad y saber. Por todo lo que ha logrado enseñarme desde el principio de mi carrera profesional y por haberme transmitido la pasión por la cirugía colorrectal. Por su aportación imprescindible en la elaboración de este trabajo, tanto en su concepción como en el desarrollo y finalización del mismo. Por ser un maestro incansable y un modelo a seguir.

Al Profesor Luis Grande por su confianza, apoyo y enseñanza desde las primeras etapas de mi formación. Por su ayuda y colaboración en el desarrollo de este trabajo y sus consejos indispensables para la finalización del mismo. Por su amplia y admirable preparación científica y por su ejemplar dedicación clínica y docente.

A la Dra. Jose Gil, Dr. Ricard Courtier y Dra. Marta Pascual, con los que comparto el trabajo diario de los últimos años aprendiendo de ellos cada día. Por su gran compañerismo, su apoyo y colaboración en los aspectos técnicos del desarrollo de este trabajo. Es un orgullo poder formar parte de este equipo.

A la Dra. Silvia Salvans y Dra. Leyre Lorente por su ayuda en la recogida y procesamiento de las muestras, uno de los puntos más arduos de este trabajo y por haber podido compartir con ellas otros muchos momentos.

Al Dr. Xavier Mayol, a la Dra. Lara Nonell y Dra. Eulàlia Puigdecanet por su colaboración indispensable en el procesamiento y comprensión de los aspectos técnicos de este trabajo. Por su tiempo y paciencia.

Al equipo de enfermeras de la unidad de cirugía y del área de quirófano por su colaboración indispensable y apoyo en la recogida de las muestras de este trabajo. Por los muchos momentos vividos inolvidables desde el inicio de mi andadura en esta profesión.

A todos y cada unos de los miembros del Servicio de Cirugía General por su colaboración en el desarrollo de esta investigación y en mi formación como cirujano y como persona.

*A vosaltres pares pel vostre amor, ajuda, suport, paciència,
esforç i comprensió de tots aquests anys.*

A Ma. Antonia i Lluís, per la seva estima, afecte, recolçament i ajuda indispensable.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal	15
1.2. Características clinicopatológicas, extensión local y diseminación del CCR	16
1.2.1. Características clinicopatológicas	16
1.2.2. Extensión local y diseminación del CCR	18
1.2.2.1. Diseminación local intramural	18
1.2.2.2. Invasión linfática	18
1.2.2.3. Diseminación hematológica	19
1.2.2.4. Diseminación transperitoneal	19
1.2.3. Clasificación de los tumores en función del grado de extensión:	
Sistema TNM	19
1.3. Tratamiento quirúrgico del cáncer de colon y recto	20
1.4. Recurrencia del CCR	23
1.4.1. Factores pronósticos de recurrencia dependientes del tumor	24
1.4.1.1. Localización	24
1.4.1.2. Grado de diferenciación y tipo histológico	25
1.4.1.3. Estadio tumoral	26
1.4.1.4. Invasión linfática, venosa y perineural	29
1.4.1.5. Respuesta inflamatoria tumoral	30
1.4.1.6. Angiogénesis tumoral	31
Definición y fases del proceso	31
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	35
Angiogénesis como factor pronóstico en el cáncer colorrectal ...	37
1.4.2. Factores pronósticos de recurrencia dependientes del cirujano y de la agresión quirúrgica	39
1.4.2.1. Calidad de la cirugía	39
Exéresis total del mesorrecto (ETM)	39
Exéresis total del mesocolon	39
1.4.2.2. Respuesta inflamatoria y angiogénica a la cirugía	41
Respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica	41
Interleuquinas proinflamatorias	42
Interleuquina-6 (IL-6)	42
Respuesta angiogénica a la cirugía	45

1.4.2.3. Complicaciones de la cirugía: asociación entre la dehiscencia de anastomosis y la recurrencia tumoral	48
2. HIPÓTESIS	53
3. OBJETIVOS	54
3.1. Objetivo general	54
3.2. Objetivos específicos	54
4. MATERIAL Y MÉTODOS	56
4.1. Diseño del estudio	56
4.2. Sujetos del estudio	56
4.2.1. Criterios de inclusión	56
4.2.2. Criterios de exclusión	56
4.2.3. Grupos de estudio	56
4.3. Técnica quirúrgica	57
4.4. Cuidados perioperatorios	58
4.5. Variables y recogida de datos	59
4.6. Definición de la infección peritoneal como complicación postoperatoria: absceso intraabdominal y dehiscencia de anastomosis	60
4.7. Obtención y análisis de las muestras de sangre y líquido peritoneal	61
4.7.1. Muestras de sangre	61
4.7.2. Muestras de líquido peritoneal	61
4.7.3. Determinaciones de citoquinas en las muestras de suero y líquido peritoneal	61
4.7.4. Microarrays de DNA	62
Análisis de los datos de los microarrays de expresión	64
4.8. Análisis estadístico	64
4.8.1. Tamaño de la muestra	64
4.8.2. Análisis de datos	65
4.9. Aspectos éticos	66
4.10. Aspectos de financiación	66

5. RESULTADOS	67
5.1. Características de los pacientes, el tumor y resultados del postoperatorio inmediato	67
5.2. Respuesta inflamatoria	72
5.2.1. Respuesta inflamatoria basal	72
5.2.2. Respuesta inflamatoria sistémica	73
5.2.3. Respuesta inflamatoria local	74
5.3. Respuesta angiogénica	76
5.3.1. Determinaciones basales de las citoquinas proangiogénicas	76
5.3.2. Respuesta angiogénica sistémica	76
5.3.3. Respuesta angiogénica local	78
5.4. Recurrencia y supervivencia	80
5.4.1. Seguimiento	80
5.4.2. Recurrencia tumoral, mortalidad y supervivencia	80
5.5. Análisis de microarrays	85
6. DISCUSIÓN	91
6.1. Infección peritoneal tras cirugía del cáncer colorrectal: dehiscencia de anastomosis y absceso intraabdominal	91
6.2. Respuesta inflamatoria y angiogénica a la infección peritoneal	96
6.2.1. Respuesta inflamatoria basal	96
6.2.2. Respuesta inflamatoria sistémica a la cirugía: influencia de la infección peritoneal	97
6.2.3. Respuesta inflamatoria local a la cirugía: influencia de la infección peritoneal	99
6.2.4. Respuesta angiogénica basal	101
6.2.5. Respuesta angiogénica sistémica a la cirugía: influencia de la infección peritoneal	105
6.2.6. Respuesta angiogénica local a la cirugía: influencia de la infección peritoneal	107
6.3. Asociación dehiscencia-recurrencia	109
6.4. Mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia	121
6.5. ¿ Existe una expresión génica de citoquinas característica que se asocie a un mayor riesgo de recurrencia ?	129

7. CONCLUSIONES	135
8. ANEXOS	136
8.1. Información para el paciente	136
8.2. Consentimiento informado	139
9. BIBLIOGRAFÍA	140

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en nuestro medio. En la actualidad constituye la tercera en frecuencia en varones tras el cáncer de próstata y pulmón y la segunda en mujeres después del cáncer de mama (Tabla 1). En el mundo occidental, cuando se consideran ambos sexos conjuntamente, ocupa el primer lugar en incidencia y representa la segunda causa de muerte por cáncer ¹. Si se compara con otros países europeos, España ocupa una posición intermedia en cuanto a incidencia y mortalidad.

Tabla 1: Incidencia de cáncer en los países de la Unión Europea en 2006.

Tasa ajustadas por 100.000/habitantes. Centro Nacional de Epidemiología.

País	Hombres					Mujeres					
	Estómago	Colorrectal	Pulmón	Próstata	Todos	Estómago	Colorrectal	Pulmón	Mama	Útero	Todos
ALEMANIA	17.60	70.20	61.20	113.00	451.40	8.50	45.10	20.80	121.20	26.40	333.70
AUSTRIA	14.30	57.60	54.00	134.60	444.60	8.80	30.90	22.30	91.50	29.10	294.60
BELGICA	10.30	53.30	93.00	160.80	543.30	3.80	34.30	22.90	137.80	32.70	343.10
BULGARIA	25.50	49.60	67.30	36.00	336.60	13.60	31.30	11.50	74.00	53.00	269.00
CHIPRE	16.20	41.20	66.10	74.60	373.70	8.70	29.00	9.50	88.40	23.30	269.60
DINAMARKE	9.10	61.00	65.00	80.30	442.00	4.50	48.00	48.70	122.60	28.70	413.60
ESLOVAQUIA	25.20	87.10	71.70	51.20	434.40	10.30	42.60	11.60	69.70	40.00	288.40
ESLOVENIA	27.50	69.00	75.60	70.20	438.50	11.00	36.30	22.90	87.50	42.80	319.00
ESPAÑA	15.90	54.40	68.30	77.20	416.90	8.40	25.40	13.80	93.60	24.50	263.40
ESTONIA	33.40	50.00	80.30	65.30	411.10	17.50	33.90	13.20	71.10	40.50	298.50
FINLANDIA	11.80	39.20	45.80	149.70	406.00	6.80	29.40	14.70	119.80	25.40	314.00
FRANCIA	12.00	59.80	75.50	133.50	527.50	4.50	36.80	15.00	127.40	22.20	329.00
GRECIA	18.90	31.00	88.70	81.00	423.90	8.90	21.30	12.70	81.80	21.30	259.50
HOLANDA	13.40	61.20	63.40	98.40	435.00	6.30	43.90	32.50	128.00	22.10	355.40
HUNGRIA	26.60	106.00	119.30	85.60	598.80	10.90	50.60	42.40	118.00	51.60	408.70
IRLANDA	14.70	65.20	60.20	182.00	513.60	7.60	36.90	34.10	131.40	28.80	382.20
ITALIA	22.10	52.00	84.70	108.40	499.70	11.10	30.30	15.60	105.30	25.10	323.60
LETONIA	28.60	47.00	82.50	85.70	419.40	14.60	28.70	10.20	64.80	39.70	265.20
LITUANIA	36.80	53.10	91.90	109.70	500.10	17.90	32.50	9.90	68.70	63.40	320.50
LUXEMBURGO	14.80	61.90	69.80	93.60	440.00	5.40	36.10	16.30	116.90	20.00	279.50
MALTA	13.70	51.50	43.90	68.80	322.80	7.10	36.20	6.50	94.50	25.70	279.50
POLONIA	34.80	43.10	103.00	51.00	443.20	8.80	27.70	28.60	74.10	37.90	311.90
PORTUGAL	28.90	58.90	44.50	101.20	427.80	15.40	30.90	11.70	103.50	33.10	289.40
R. CHECA	17.00	94.40	78.90	76.10	484.00	8.20	46.00	22.90	84.80	44.80	346.00
REINO UNIDO	14.30	54.90	57.10	107.30	410.50	5.70	34.80	34.60	122.20	25.20	348.90
RUMANIA	30.60	40.70	81.00	32.20	371.80	13.00	25.10	15.40	61.20	64.10	279.10
SUECIA	9.20	49.20	28.60	157.20	418.20	4.90	37.40	23.80	125.80	31.70	361.30

La incidencia del CCR varía en función de la edad ², siendo del 0,87% en los individuos menores de 50 años y del 5,8% en personas de más de 80. Se estima que la incidencia de CCR en España en el año 2006 fue de 22.000 nuevos casos. Esta incidencia ha sido calculada a partir de modelos basados en los datos de la mortalidad y de la incidencia de aquellas áreas geográficas donde existen registros de cáncer, con datos del período 1993-1997. El número de casos prevalentes originados en los últimos años es de 65.000, 29.000 mujeres y 36.000 varones.

En España se produjeron 7.603 muertes por CCR en varones y 5.580 en mujeres durante el año 2006, lo que representa un 12% de las defunciones por cáncer en varones y un 15% en mujeres ³. Los datos de mortalidad no reflejan la incidencia de la enfermedad, ya que la supervivencia ha mejorado en los últimos años. En España, la supervivencia a los 5 años se sitúa dentro de la media de los países europeos (54.9% para cáncer de colon y 51.7% para cáncer de recto)⁴. La tendencia reciente al descenso de la mortalidad puede reflejar las mejoras terapéuticas obtenidas con un diagnóstico precoz y a la generalización de las colonoscopias completas en grupos de riesgo identificados.

1.2. Características clinicopatológicas, extensión local y diseminación del CCR.

1.2.1. Características clinicopatológicas

Más del 95% de las neoplasias malignas de colon y recto son adenocarcinomas. Aunque es frecuente la presencia de células mucinosas, sólo cuando éstas aparecen en más del 50% de la muestra se denominan adenocarcinomas mucinosos, tipo que representa menos del 5% del total de carcinomas. Los carcinomas escamosos son excepcionales, menos del 1% del total, más frecuentes en el recto que en el colon.

Según el grado de diferenciación, los adenocarcinomas se dividen en alto y bajo grado. Estos últimos suponen más del 80% e incluyen los denominados moderadamente y bien diferenciados según la antigua clasificación ⁵.

La mayoría de los tumores se localizan en el recto (39%) y el sigma (35%), siendo menos frecuentes en el colon ascendente (8%), ciego (6%), colon descendente (4%), colon transverso (4%), flexura hepática (2%) y flexura esplénica (2%) (Figura 1).

Los síntomas y signos más frecuentemente asociados al CCR son, por orden de frecuencia: el dolor abdominal (47%), la rectorragia (30%) mezclada o no con las heces, el estreñimiento (20%), la anemia ferropénica (18%) y la diarrea (16%). Otras manifestaciones clínicas, como la presencia de una masa abdominal, la oclusión intestinal o la pérdida de peso, suelen indicar un proceso neoplásico avanzado ⁵.

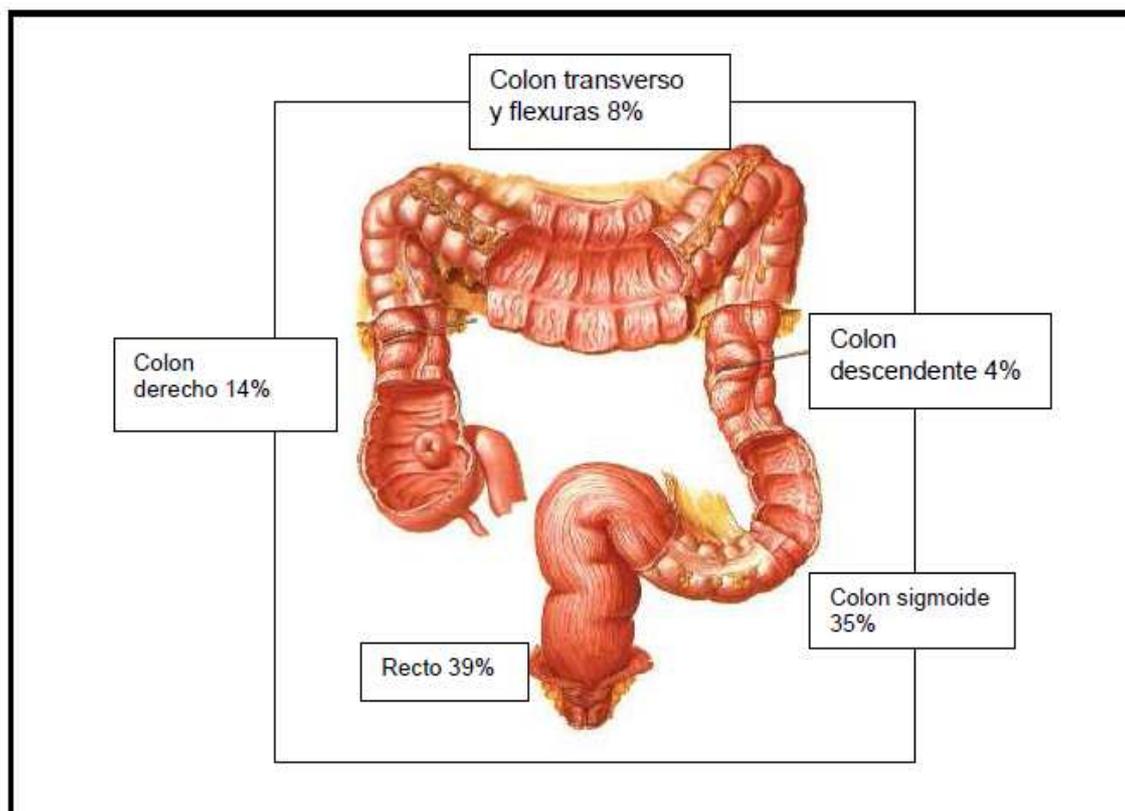


Figura 1: Frecuencia de la localización del CCR

1.2.2. Extensión local y diseminación del CCR

Al igual que la mayoría de las neoplasias, el cáncer de colon y recto se puede diseminar por varias vías. Esta diseminación puede ser local o a distancia.

1.2.2.1. Diseminación local intramural

La capa muscular de la pared colónica ofrece una resistencia considerable a la infiltración tumoral, pero a partir de ésta, los tejidos adiposo y conectivo se sobrepasan fácilmente. El peritoneo también muestra bastante resistencia a la invasión neoplásica. A diferencia del estómago y del esófago, la extensión longitudinal es corta y no suele superar los 2 cm ⁶.

En el momento del diagnóstico menos del 5% de los tumores están limitados a la mucosa, un 10% aproximadamente alcanzan la capa muscular sin sobrepasarla, mientras que en la mayoría de los tumores, un 60%, la infiltración intramural alcanza la grasa subserosa. Finalmente, un 25% de los tumores han perforado la serosa o invaden órganos adyacentes en el momento del diagnóstico.

1.2.2.2. Invasión linfática

Este tipo de diseminación es el mecanismo más común para el desarrollo de la enfermedad metastásica. En primer lugar, se producen metástasis ganglionares regionales, siguiendo casi siempre el camino más directo por los vasos linfáticos que acompañan a las arterias que irrigan el segmento intestinal donde asienta el tumor. La invasión linfática se correlaciona con la profundidad de penetración del cáncer de colon. Entre un 5% y un 10% de los tumores limitados a la mucosa presentan metástasis linfáticas, mientras que aquellos tumores en los que la infiltración alcanza la capa muscular o la sobrepasa, la afectación ganglionar asciende al 25% y 45% respectivamente.

1.2.2.3. Diseminación hematológica

La diseminación hematológica se produce en general a través de la vena porta hacia el hígado (metástasis hepáticas) y una vez pasado el filtro hepático, o directamente por venas que drenan a la cava, entran en el torrente sanguíneo sistémico (metástasis pulmonares). Otras localizaciones descritas, por orden de frecuencia, son el ovario, tejido óseo y cerebro. Aproximadamente el 20% de los pacientes presentan metástasis a distancia en el momento del diagnóstico ⁷.

1.2.2.4. Diseminación transperitoneal

Cuando la neoplasia rompe la barrera del peritoneo visceral pueden producirse siembras celulares y metástasis del tumor primario en la amplia superficie peritoneal tanto visceral como parietal, lo que se conoce como carcinomatosis peritoneal. La superficie peritoneal está afectada en un 10%-15% de los pacientes con CCR en el momento del diagnóstico. Este tipo de diseminación tiene gran importancia clínica por su frecuente progresión hacia la ascitis carcinomatosa o la obstrucción intestinal.

1.2.3. Clasificación de los tumores en función del grado de extensión:

Sistema TNM

El denominado sistema TNM es la clasificación del grado de extensión de las neoplasias desarrollada por dos comités americanos: American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la International Union Against Cancer (UICC). Se utilizan tres descripciones basadas en la profundidad Tumoral, la afectación ganglionar (**N**ode) y la existencia de **M**etástasis. La definición más reciente de estas variables publicada por la AJCC/UICC fue en el año 2009 ⁸ designando una estadificación tumoral (Estadio 0, I, II, III, IV) para definir el cáncer colorrectal.

1.3. Tratamiento quirúrgico del cáncer de colon y recto

El objetivo de la cirugía es extirpar el tumor primario y el correspondiente drenaje linfático sin causar diseminación tumoral e intentando preservar la calidad de vida del paciente.

En el caso del cáncer de colon, apenas se han producido cambios en los últimos años y la colectomía segmentaria sigue siendo la forma principal de tratamiento. La quimioterapia adyuvante está indicada en pacientes en estadio III y en pacientes en estadio II con factores de mal pronóstico. Hoy en día es una intervención estandarizada en la que se considera que respetar un margen de 2 cm más allá del tumor es oncológicamente adecuado. No obstante, la extensión de la resección depende del drenaje linfático del segmento del colon en el que está situado el tumor por lo que, en la mayoría de los casos, el margen supera ampliamente los 2 cm. La ligadura del pedículo mesentérico debe realizarse en el origen de los vasos segmentarios. Desde este punto de vista se puede considerar que existen cuatro tipos de intervenciones según que el tumor esté localizado en el colon derecho, el colon transversal, el colon izquierdo y el sigma (Figura 2). La colectomía derecha implica la sección de los siguientes pedículos vasculares: vasos ileocólicos, cólicos derechos y la rama derecha de los vasos cólicos medios. Si el tumor se encuentra en el colon transversal a esta sección se le añade la de los vasos cólicos medios en su origen. Si el tumor se encuentra en el colon descendente la sección incluye la ligadura de la arteria mesentérica inferior proximal a la arteria cólica izquierda y si se encuentra en el sigma la arteria mesentérica inferior se puede ligar distal a los vasos cólicos izquierdos. Respecto a los tumores localizados en la flexura esplénica existen varias opciones. Aunque para algunos cirujanos la tendencia es hacer una colectomía izquierda, una opción técnica realizada con frecuencia es la colectomía derecha ampliada practicando una anastomosis íleo-sigmoidea. Las razones para ello son, por

una parte, las posibles anomalías vasculares del colon, cuya vascularización puede depender más del lado derecho y, por otra, la consideración de que la anastomosis del colon transverso al recto no siempre puede conseguirse sin tensión.

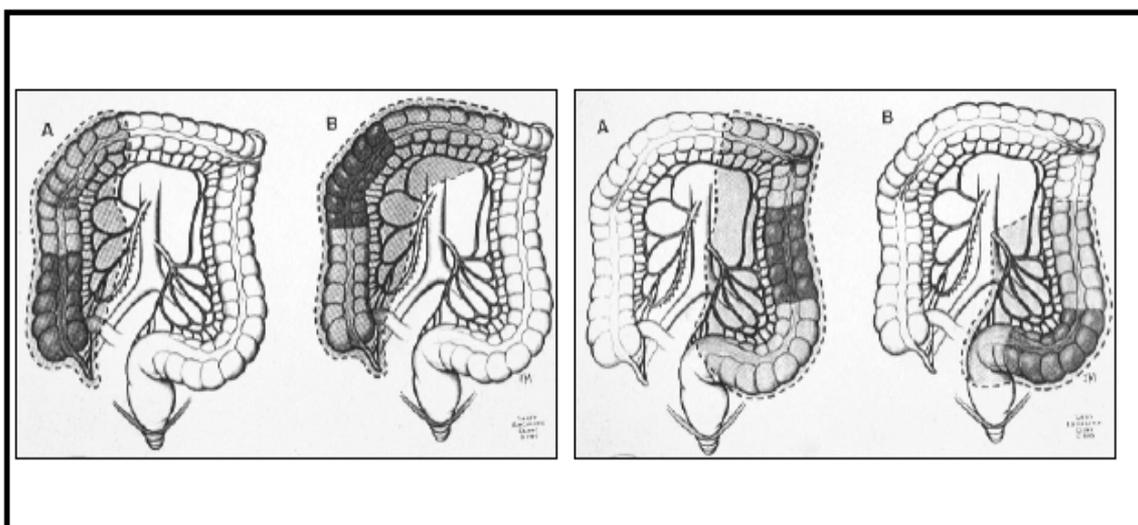


Figura 2. Tipos de resecciones según la localización del tumor: de izquierda a derecha: hemicolectomía derecha, hemicolectomía derecha ampliada, hemicolectomía izquierda y sigmoidectomía⁹.

A diferencia de lo que ha sucedido con el tratamiento quirúrgico del cáncer de colon, en los últimos años se han producido cambios muy importantes en el tratamiento del cáncer de recto con la introducción de la quimiorradioterapia neoadyuvante, la exéresis total del mesorrecto, diferentes técnicas de preservación de esfínteres y varias opciones de reconstrucción tras una resección anterior baja.

La exéresis total del mesorrecto (ETM), descrita en 1986 por Heald et al.¹⁰, se define como la completa exéresis del tejido mesorrectal y la fascia que lo envuelve de forma intacta, sin afectación ni del margen circunferencial, y preservando los nervios autonómicos pélvicos. La técnica consiste en una disección meticulosa del plano anatómico avascular que rodea la fascia mesorrectal bajo visión directa.

El mesorrecto es el tejido graso que se encuentra en el espacio situado entre la pared rectal y la hoja visceral de la fascia rectal. Por delante, la fascia rectal interviene en la

formación de la aponeurosis de Denonvilliers en los varones y del tabique rectovaginal en las mujeres. Este tejido celulo-graso contiene los vasos y los linfáticos perirrectales. Se desarrolla sobre todo en las tres cuartas partes de la circunferencia del recto subperitoneal, por detrás y lateralmente hasta 2 a 3 cm de la unión anorrectal. La cara anterior del recto infraperitoneal y los 2 o 3 últimos centímetros de la porción pélvica del recto suelen carecer de tejido graso. En el mesorrecto se produce la parte esencial de la invasión linfática de los cánceres rectales.

Desde el punto de vista quirúrgico, el recto se puede dividir en tres partes: el *recto superior*, que incluye la mitad superior de la ampolla rectal que se sitúa por encima del saco de Douglas, se extiende de 11 a 15 cm del margen anal; el *recto medio* que empieza en la mitad inferior de la ampolla rectal y desciende hasta el borde superior de los elevadores (comprende desde 7 a 11 cm del margen anal) y corresponde al recto infraperitoneal; y por último el *recto inferior* que se extiende desde 3-4 a 7 cm del margen anal ¹¹. Este concepto de localización anatómica del tumor rectal es importante para establecer un esquema de tratamiento adecuado dependiendo del estadio locorregional. Desde el punto de vista quirúrgico, en los tumores localizados en el recto medio e inferior se recomienda exéresis completa del mesorrecto, independientemente de que se restablezca o no la continuidad intestinal. Por el contrario en tumores del recto superior basta con una sección del recto 5 cm por debajo del tumor, siempre que se extirpe el mesorrecto correspondiente según la técnica de la exéresis completa del mesorrecto, es decir, respetando la fascia mesorrectal hasta la altura de la zona de sección ¹².

Actualmente todas las resecciones de cáncer de colon y recto pueden realizarse por vía laparoscópica. Se ha demostrado que es una vía de abordaje segura, que ofrece ventajas clínicas en el postoperatorio inmediato y a la vez no perjudica los resultados

oncológicos de la operación. La demostración de las ventajas clínicas y de la seguridad oncológica del abordaje laparoscópico se ha evidenciado en estudios multicéntricos como el COST¹³, COLOR¹⁴ y COLOR II¹⁵.

1.4. Recurrencia del CCR

Hasta un 40% de los pacientes con CCR a los que se ha practicado un tratamiento quirúrgico con intención curativa presentarán una recurrencia local, a distancia o combinada a lo largo del seguimiento¹⁶.

La recidiva locorregional, definida como aquella que se produce en la anastomosis, en el lecho quirúrgico y/o en el territorio de drenaje linfático, oscila entre un 3% y un 15%, según las series publicadas¹⁷. Este porcentaje de recurrencia local es menor tras cirugía curativa de cáncer de colon en comparación con la del cáncer de recto¹⁸. Hasta en el 80% de los casos la recidiva local se asocia a metástasis a distancia^{17, 19}. La recidiva sistémica o a distancia se define como aquella que tiene lugar en órganos alejados del lecho quirúrgico y cuya diseminación principalmente se produce por vía hematogena. El hígado es el órgano afectado en la mayoría de las recurrencias a distancia, entre un 50% y un 80% de los casos, seguido por el pulmón y los huesos. El 70% de las recurrencias se diagnostican en los dos primeros años del seguimiento y el 90% en los 4 primeros años después de la cirugía²⁰.

La recidiva tumoral depende fundamentalmente de la afectación ganglionar. Sin embargo, además del estadio tumoral existen otras variables con valor pronóstico que influyen en el resultado oncológico, como determinadas características patológicas del tumor primario, la administración de tratamiento adyuvante y, por supuesto, la calidad de la cirugía.

1.4.1. Factores pronósticos de recurrencia dependientes del tumor

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

1.4.1.1. Localización

Varios estudios han evidenciado diferencias en las características clínicas y patológicas en función de la localización tumoral, ya sea en los segmentos de colon proximal (hasta flexura esplénica) o distal, aunque los resultados obtenidos son objeto de controversia. Derwinger et al.²¹ en un análisis retrospectivo de todos los pacientes operados por su grupo de cáncer de colon (n=1558) durante el periodo 1999-2008 objetivaron que los carcinomas localizados en colon sigmoide tenían un mejor pronóstico en comparación con los localizados en colon derecho y en colon izquierdo, ya que diferenciaban entre colon sigmoide y colon izquierdo. Mientras Weiss et al.²² analizaron la relación de la localización de la neoplasia, derecha o izquierda, con la mortalidad según estadio tumoral. Observaron que en los estadios II los cánceres localizados en colon derecho tenían una menor mortalidad mientras que en estadio III presentaban una mayor mortalidad en comparación con las neoplasias en colon izquierdo. En una revisión sistemática reciente de Hansen et al.²³ hallaron que las neoplasias en colon derecho en comparación a los localizados en colon izquierdo se presentaban en pacientes de más edad, predominantemente en mujeres, en pacientes con más comorbilidades, las neoplasias eran de estadios más avanzados, tenían mayor tamaño y el tipo histológico más habitual era el pobremente diferenciado. En el análisis multivariante los factores con una influencia directa sobre la supervivencia era la edad, el sexo, el modo de presentación (electivo/urgente), las comorbilidades asociadas y el estadio tumoral, mientras que la localización del tumor por si misma no tenía una clara relación con el pronóstico.

Las diferencias anatómicas, biológicas y moleculares entre el colon y el recto hacen que estemos ante dos entidades con pronósticos y tratamientos diferentes y específicos. La diseminación del cáncer de colon se produce básicamente por la afectación de la serosa, mientras que los cánceres de recto no afectan directamente la cavidad peritoneal. La estadificación tumoral, según la clasificación TNM, es el factor pronóstico más importante en el cáncer de colon; sin embargo, en el cáncer de recto tan importante como la clasificación TNM es la afectación del margen circunferencial puesto que cuando ocurre se incrementa significativamente la probabilidad de recurrencia local y disminuye la supervivencia ²⁴.

1.4.1.2. Grado de diferenciación y tipo histológico

El grado de diferenciación histológico es un factor pronóstico independiente en pacientes con CCR ^{25, 26}. Dependiendo de la arquitectura glandular y de las diferentes características citológicas (polaridad celular y diferenciación, estratificación nuclear, tipo de núcleo o nucléolo) podemos clasificar a las neoplasias en ²⁷:

- **Bajo grado:** los tumores bien diferenciados o moderadamente diferenciados.
- **Alto grado:** los tumores pobremente diferenciados o indiferenciados.

La estratificación en dos grados se ha demostrado que es mucho más fácil de reproducir (menor variabilidad interobservador) y mayor relevancia pronóstica que la estratificación en cuatro niveles (bien, moderado y pobremente diferenciado e indiferenciado). Los tumores de alto grado son los que tiene un peor pronóstico.

Los adenocarcinomas mucinosos desarrollan con mayor frecuencia metástasis peritoneales, invasión a órganos vecinos y afectación ganglionar ²⁸. Los adenocarcinomas mucinosos están asociados a los cánceres colorrectales con

inestabilidad de microsatélites y tienen un mejor pronóstico en comparación con aquellos que presentan estabilidad de microsatélites. Los tumores de células en anillo de sello representan un 1% de los casos de CCR y son más frecuentes en pacientes jóvenes menores de 50 años y en pacientes con colitis ulcerosa. En el momento del diagnóstico la mayoría presenta un estadio tumoral avanzado e incluso carcinomatosis peritoneal. Similar es el comportamiento de los carcinomas de células pequeñas. Son los únicos tipos histológicos en los que se ha demostrado un peor pronóstico independiente del estadio tumoral ²⁹.

1.4.1.3. Estadio tumoral

El factor pronóstico más importante del CCR es el estadio tumoral en el momento del diagnóstico. Tal y como se ha mencionado anteriormente el sistema de estadificación más ampliamente utilizado es el TNM desarrollado por el AJCC and International Union Against Cancer ⁸.

La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años según el estadio tumoral TNM es en Estadio I del 93%, Estadio IIa del 85%, Estadio IIb del 72%, Estadio IIIa del 83%, Estadio IIIb del 64%, Estadio IIIc del 44% y Estadio IV del 8% ³⁰.

En cuanto a la invasión de la pared del colon, los tumores que tienen un mejor pronóstico son aquellos que, dentro de la clasificación del TNM, se incluyen en la categoría pTis o “carcinomas in situ”, cuando las células tumorales están confinadas a nivel glandular o invaden la lámina propia (intramucosa). Este tipo de lesiones no producen metástasis ²⁶. En el otro extremo, nos encontramos con los tumores que invaden el peritoneo visceral por extensión directa a través de la pared y que pueden llegar a invadir directamente órganos o estructuras vecinas. Estos tumores son clasificados dentro de la categoría pT4. Histológicamente se considera afectación de la

serosa cuando el tumor está presente en la superficie de la serosa con reacción inflamatoria, hiperplasia mesotelial y/o erosión o ulceración del peritoneo visceral^{8, 31, 32}.

Estudios previos habían sugerido que la invasión de la serosa se asociaba a un peor pronóstico en comparación con la afectación de órganos vecinos. Sin embargo, recientemente los datos obtenidos en una cohorte amplia de pacientes con CCR indican que la invasión del peritoneo visceral tiene entre un 10-20% mejor supervivencia a los 5 años que los pacientes con afectación de órganos vecinos independientemente de la afectación ganglionar^{33, 34}. Por ese motivo la categoría de T4 ha cambiado en la séptima edición de la clasificación del TNM. Cuando invade únicamente el peritoneo visceral se trataría de un T4a mientras que cuando el tumor está adherido o invade estructuras vecinas lo clasificaríamos como T4b⁸.

Otro de los factores pronósticos más importante es la presencia o ausencia de la afectación ganglionar y que de hecho es la que determina el estadio tumoral en aquellos casos en los que no hay metástasis a distancia. Es importante tanto el número de ganglios afectados como el total de los examinados. Con respecto a ediciones previas de la clasificación del TNM y en esta última edición⁸ se realiza una subdivisión de las categorías N1y N2, ya que se han observado diferencias clínicas dependiendo del número de ganglios afectados^{33, 34}.

El examen histológico ordinario de la grasa que rodea el colon tras una resección segmentaria debería incluir 12 o más ganglios linfáticos. Son muchos los factores que influyen en la recuperación y evaluación de estos ganglios, una resección quirúrgica adecuada, un examen histopatológico adecuado, factores dependientes del paciente y las características del propio tumor^{35, 36}. El número de ganglios disecados se considera

un indicador de calidad en el cáncer de colon y se considera adecuado entre 12 y 15³⁷. Las metástasis en los ganglios linfáticos en el CCR se hallan habitualmente en ganglios pequeños, de menos de < 5 mm de diámetro, motivo por el cual se necesita un meticuloso examen por parte del patólogo. Cuando se identifican menos de 12 ganglios se realiza un segundo examen con otras técnicas de detección. En el cáncer de recto tratado con neoadyuvancia el número de ganglios detectados suelen ser inferior a 12²⁹.

Varios estudios han demostrado la importancia del número de ganglios evaluados en el espécimen como factor pronóstico en el CCR. Específicamente, muchos de ellos han demostrado una mayor supervivencia en pacientes en estadio II asociado a un mayor número de ganglios evaluados. La misma asociación positiva se ha demostrado en pacientes con CCR en estadio III^{35, 38}. Otros estudios sugieren que la identificación de micrometástasis en los ganglios linfáticos de pacientes con CCR estadio III podría tener un valor pronóstico^{39, 40}. Sin embargo, actualmente no hay suficientes evidencias para realizar este análisis de forma rutinaria⁸.

Los depósitos tumorales (nódulos satélites) son nidos de células tumorales, macroscópicos o microscópicos, localizados en la grasa pericolónica en el lugar del drenaje linfático pero que no corresponden a tejido ganglionar. En lesiones tumorales T1-2 sin afectación ganglionar pero con depósitos tumorales serán clasificados según la última versión del TNM en N1c⁸ sin alterar la categoría de la T. Esta última clasificación es controvertida ya que se ha demostrado que este tipo de cánceres con depósitos tumorales están asociados a un peor pronóstico⁴¹ y por lo tanto tendrían que clasificarse aparte según su presencia o ausencia y el número total⁸.

1.4.1.4 Invasión linfática, venosa y perineural

Múltiples estudios han demostrado que la invasión venosa es un factor independiente de mal pronóstico en pacientes con cáncer colorrectal ⁴²⁻⁴⁴. Particularmente, la invasión venosa extramural está asociada a un mayor riesgo de mortalidad relacionada con el cáncer por su capacidad de producir metástasis hematógenas. Sin embargo, de la invasión venosa intramural y linfática es menos clara la relación con el pronóstico de estos pacientes ²⁹.

La incidencia de la invasión venosa en el CCR es muy variable, entre un 11% al 89,5% según las series ⁴³. Las diferencias no son únicamente debido a los estadios tumorales de las series analizadas, si no al método utilizado en su detección y en su interpretación. Existe una gran variabilidad interobservador ya que la infiltración y la propia destrucción de los vasos por el tumor hace dificultosa su detección. Las técnicas de inmunohistoquímica ayudan a un diagnóstico más preciso, pero no se realizan de forma rutinaria ya que son mucho más laboriosas y con mayor coste ²⁶. Otra característica histológica importante en los CCR es la presencia o no de la invasión perineural. Es un proceso caracterizado por la invasión de las estructuras nerviosas por células neoplásicas y su diseminación a través de la vaina de los mismos nervios. Es un factor de mal pronóstico independiente de supervivencia específica relacionada con el cáncer y global en pacientes con CCR^{26, 45}. Se ha sugerido que en pacientes sin afectación ganglionar pero con invasión neural deberían recibir tratamiento adyuvante por el alto riesgo de recurrencia tumoral⁴⁵.

1.4.1.5 Respuesta inflamatoria tumoral

La progresión tumoral no depende exclusivamente de las características intrínsecas del tumor sino también de un complejo proceso de interacción entre el tumor y el huésped. Se ha demostrado que el CCR, al igual que otras neoplasias, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el huésped que puede ser un factor de mal pronóstico independiente del estadio tumoral⁴⁶⁻⁴⁹. Esta respuesta inflamatoria ha sido cuantificada mediante la determinación en suero de la proteína C reactiva (PCR)⁵⁰, la interleuquina-6 (IL-6)⁵¹ o incluso el cálculo de un *score* basado en varios parámetros relacionados con la inflamación⁴⁸, los cuales están significativamente más elevados que en controles sanos. La elevación de estos factores es reflejo de la respuesta inflamatoria no específica secundaria a la necrosis tumoral y al daño tisular local. Asimismo, la activación de la respuesta inflamatoria sistémica podría reflejar tanto el fenotipo como la capacidad metastásica del propio tumor⁴⁹. Varios estudios han demostrado que los niveles preoperatorios de IL-6 en suero se correlacionan con el tamaño del tumor, el valor del CEA y con el estadio tumoral^{51, 52}. Esta respuesta es la responsable de muchos de los cambios en el metabolismo proteínico y energético que tienen lugar en pacientes con cáncer, y es especialmente evidente en pacientes caquéticos con neoplasias en fase avanzada⁴⁶.

En otro sentido, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria celular que ocurre localmente frente a la presencia tumor se asocia a un mejor pronóstico en pacientes con CCR⁵³. Son numerosos los estudios que han analizado los diferentes tipos de células inmunológicas peritumorales e intratumorales implicadas en la evolución y pronóstico de estos tumores^{47, 48, 54, 55}. En concreto, los linfocitos citotóxicos T (CD8+) y los T reguladores (FOXP3+) juegan un papel importante en la progresión tumoral. Por lo tanto el estudio del tipo, densidad y localización de la

infiltración inmunitaria celular en el tumor primario podría proporcionar información sobre la probabilidad de recurrencia y supervivencia en los pacientes con CCR⁵³.

1.4.1.6 Angiogénesis tumoral

En los últimos años varios trabajos han demostrado que la angiogénesis tumoral es otro factor pronóstico que adquiere gran relevancia ante las nuevas formas de tratamiento adyuvante. Un grado elevado de angiogénesis tumoral se asocia a un mayor riesgo de recurrencia y una menor supervivencia en pacientes con cáncer de colon y recto⁵⁶⁻⁶⁰.

Definición y fases del proceso

La angiogénesis es un fenómeno descrito en la década de los 70 por el cirujano e investigador en cáncer Judah Folkman, que consiste en la formación de nuevos vasos a partir de capilares preexistentes mediante la proliferación y migración de células endoteliales⁶¹. Esta neovascularización es imprescindible para el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Se ha observado que, en ausencia de angiogénesis, los tumores no pueden crecer más de 1-2 mm. La proliferación activa de células tumorales, que habitualmente ocurre en la fase de crecimiento inicial de los tumores, se equilibra con el proceso de muerte celular producido por el alejamiento del aporte sanguíneo de las células tumorales. Mediante la observación directa del tumor se ha demostrado que el rápido crecimiento exponencial no ocurre hasta que se produce una neovascularización y que el proceso de angiogénesis es paralelo al proceso de formación de metástasis⁶².

Se han propuesto 2 vías por las que los nuevos vasos se pueden formar: a) *sprouting* (formación de brotes), y b) *non sprouting* (por inserción de tejido intersticial entre la luz del vaso preexistente) ⁶³. Además de estos dos mecanismos, la angiogénesis tumoral puede estar también sustentada por la movilización e incorporación funcional de los precursores de las células hematopoyéticas, que se trasladarían desde la médula ósea para integrarse en los nuevos vasos formados ⁶⁴.

Actualmente se reconocen varias fases para la formación de los vasos (Figura 3). Durante la fase inicial de la angiogénesis se produce una vasodilatación de los vasos preexistentes (capilares y vénulas) mediada por diferentes citoquinas que aumenta su permeabilidad y activan las células endoteliales. Posteriormente, mediante la acción de diversas enzimas proteolíticas denominadas metaloproteasas, se produce la degradación de la membrana basal y su rotura. En una segunda fase se promueve la proliferación y migración de las células endoteliales para formar los nuevos brotes que penetran entre las redes de las células tumorales en crecimiento. Las células endoteliales migradas se alinean en cordones y brotes sueltos formando una luz entre el brote de avance. Cuando todos los brotes se conectan se restablece el flujo ⁶³.

En la angiogénesis tumoral se produce una combinación de angiogénesis y vasculogénesis. Mientras que el principal aporte sanguíneo del tumor se deriva de los vasos preexistentes, los precursores de las células endoteliales circulantes también pueden contribuir al crecimiento de la masa celular endotelial ⁶⁵.

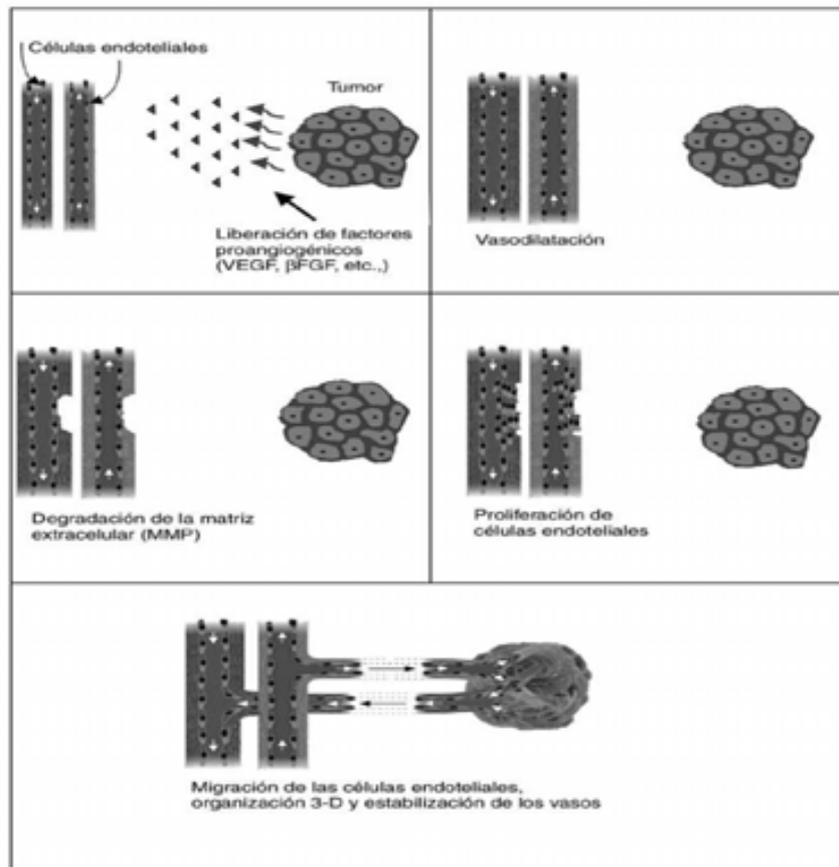


Figura 3: Fases de la Angiogénesis ⁶⁶:

VEGF: factor de crecimiento vascular; β FGF: factor de crecimiento de fibroblastos beta

En la angiogénesis participan diferentes tipos celulares así como componentes solubles y factores de la matriz extracelular y que, a excepción de determinados procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la curación de las heridas y el ciclo menstrual, se encuentran en un estado quiescente. Este estado es el resultado del equilibrio entre factores inductores e inhibidores producidos por las propias células tumorales y por otras células dentro del microambiente que rodea al tumor (Tabla 2). Estos factores pueden ser circulantes o actuar localmente como factores paracrinos. El cambio en el equilibrio entre inductores e inhibidores pueden activar el denominado “angiogenic switch” (Figura 4) o interruptor angiogénico estimulando la formación de nuevos vasos ⁶⁷. La activación de la angiogénesis puede estar influida por factores ambientales como la hipoxia, la acidosis y la inflamación, frecuentes durante el

proceso de crecimiento tumoral. El factor más potente capaz de inducir la angiogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Tabla 2: Factores reguladores de la angiogénesis

Factores pro-angiogénicos		Factores anti-angiogénicos	
Factor	Función biológica	Factor	Función biológica
VEGF	↑permeabilidad, proliferación y migración de las CE, ↓apoptosis CE	Angiostatina	↓proliferación y migración de CE. ↓formación tubo vascular, ↑apoptosis CE.
FGF	↑proliferación y migración de las CE. ↑activadores del plasminógeno	Endostatina	↓ proliferación y migración de CE. ↑apoptosis CE
Ang-1	Formación de los brotes vasculares y estabilización de los vasos	Ang-2	↑apoptosis CE
Ang-2	↑proliferación y migración de las CE. Formación de los brotes vasculares en presencia de VEGF	TGFβ	↓proliferación y migración de CE. ↑apoptosis CE
PDGF	Estabilización de los vasos	TNFα	Inhibición de la proliferación de CE mediada por FGF, ↑apoptosis CE
TGFβ	Estabilización de los vasos	TSP1yTSP2	↓migración y ↑apoptosis CE
TNFα	↑migración de CE	MMP	Generación de angiostatina
EGF	↑ proliferación CE	PEDF	↓proliferación y migración de CE.
CSFs	↑ proliferación y migración de CE		
Angiogenina	↑ proliferación CE		
Angiotropina	↑migración de CE y formación del tubo		
IGF-1	↑proliferación CE. ↓apoptosis de CE. Inducción del VEGF, ↑activadores del plasminógeno		
HGF	↑proliferación y migración de CE		
PECAM-1	↑agregación y migración de CE, angiogénesis inducida por FGF		
Integrinas	↑adhesión y migración de CE. Angiogénesis inducida por FGF. ↓apoptosis de CE.		
Óxido nítrico	↑permeabilidad, proliferación CE, liberación FGF		

MMP: degradación de la matriz extracelular, MEC: matriz extracelular, FGF: factor de crecimiento de fibroblastos, VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, CE célula endotelial, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

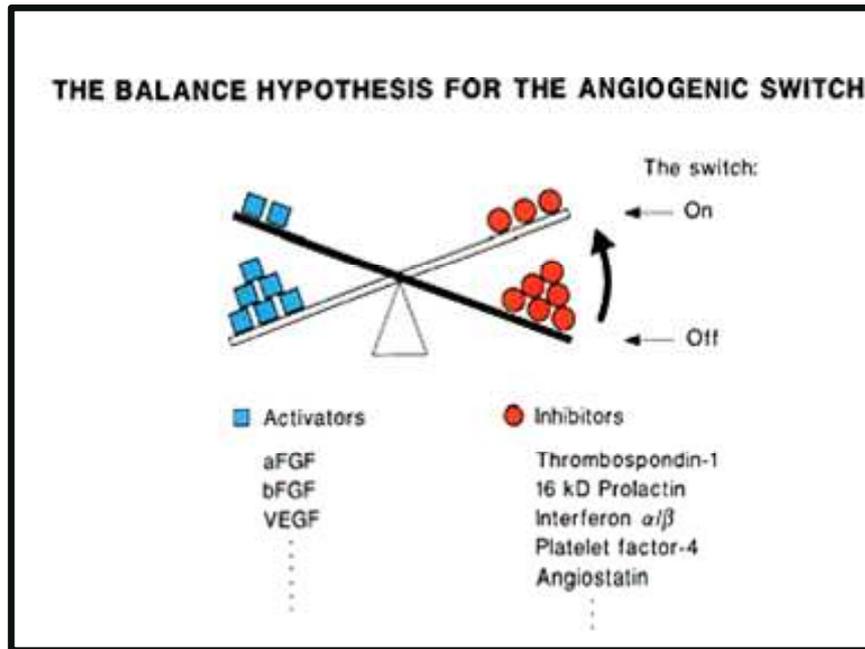


Figura 4: Equilibrio entre inductores e inhibidores de la angiogénesis “angiogenic switch”⁶⁸.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El VEGF es la proteína mejor caracterizada y más importante del proceso angiogénico. Aunque su origen y localización no está del todo aclarado, se considera que la principal fuente de este factor son las plaquetas y los leucocitos^{69, 70}. Más recientemente se ha demostrado su presencia en grandes cantidades en las células de músculo estriado⁷¹.

Hasta ahora se han descrito varias glicoproteínas que conforman la familia del VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PGF-1 y -2)⁷². Todas las variantes del ligando de VEGF se expresan en el cáncer de colon con predominancia del VEGF-A, seguido por el VEGF-B, el VEGF-C y el VEGF-D⁷³. El VEGF-A (corresponde al que comúnmente denominamos VEGF) fue el que se describió en primer lugar e inicialmente se conoció como factor de permeabilidad vascular⁷⁴. Se han descrito 6 isoformas del VEGF-A (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) que difieren en sus propiedades y funciones. El VEGF₁₂₁

es secretado en forma libre, mientras que las isoformas mayores (VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) están secuestradas en la matriz extracelular y requieren la acción de las proteasas para su activación. El VEGF₁₆₅ existe tanto en la forma soluble como en la forma unida a la matriz extracelular. Esta isoforma es la predominante y está comúnmente sobreexpresada por diferentes tipos de tumores sólidos. Algunos estudios recientes sugieren que los patrones de expresión de cada una de las isoformas del VEGF son específicos de cada tejido lo que implica que estas isoformas tienen unos papeles definidos tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis tumoral ⁷².

Asimismo, se conocen tres receptores del VEGF: VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR/Fik-1) y VEGF-R3 (KDR/Flt-1). Los 2 principales receptores, Flt-1 y KDR, se expresan en las células endoteliales cuando se encuentran en fase de proliferación. La unión del VEGF con sus receptores es de tipo tirosinquinasa y activa diversas vías de señal que intervienen en diferentes pasos en la angiogénesis. Mediante la activación de los receptores en las células endoteliales, VEGF media múltiples funciones. En primer lugar, VEGF tiene la capacidad de estimular la permeabilidad vascular a las macromoléculas circulantes, por lo que inicialmente fue denominado factor de permeabilidad vascular. De hecho, el VEGF es uno de los inductores de permeabilidad vascular más potente conocido, con una capacidad hasta 50.000 veces superior a la histamina ^{72, 74}. Este aumento de la permeabilidad microvascular es uno de los principales efectos del VEGF, especialmente en relación a la de los vasos tumorales que es atribuida fundamentalmente a la expresión de VEGF por el propio tumor. El VEGF incrementa la permeabilidad en diferentes lechos vasculares incluida la piel, el peritoneo, el mesenterio y el diafragma y puede contribuir a condiciones patológicas como la ascitis o el derrame pleural maligno. Otro de los efectos del VEGF es la activación de las células endoteliales que incluye cambios en su morfología, alteraciones del citoesqueleto y estímulo de la proliferación y migración.

Se ha demostrado que el VEGF no sólo es mitógeno para las células endoteliales sino que además induce una serie de proteínas importantes en el proceso de la degradación de la membrana basal que facilita la migración y el *sprouting* de las células del endotelio vascular.

Varios estudios *in vitro* han demostrado que la hipoxia es un potente estimulador de la expresión de VEGF tanto en líneas celulares de roedores como humanas ⁷⁵⁻⁷⁸. Además, varios oncogenes están implicados en el proceso de angiogénesis de los tumores sólidos, en parte por su capacidad de inducir factores proangiogénicos como el VEGF ⁷⁹. Se ha sugerido que el VEGF está implicado en el crecimiento tumoral no sólo por su efecto inductor de la angiogénesis sino también por actuar directamente sobre las células tumorales en las que se ha demostrado la expresión de VEGFR⁸⁰⁻⁸⁴.

Angiogénesis como factor pronóstico en el cáncer colorrectal

Estudios realizados en diferentes neoplasias han demostrado que el grado de angiogénesis se relaciona con la probabilidad de desarrollar metástasis y con la supervivencia del paciente. Así, se ha comprobado que la angiogénesis es un factor pronóstico independiente, al igual que el grado de diferenciación y la afectación ganglionar, en diferentes tipos de tumores⁸⁵⁻⁸⁹ entre los que se encuentra el CCR^{57, 60}. La angiogénesis tumoral, cuantificada mediante la determinación de la densidad microvascular tumoral, es un factor predictivo de recurrencia en pacientes en estadio II ⁵⁷ y se correlaciona con la aparición de metástasis hematógenas ^{90, 91}.

Se ha observado además que la detección de células epiteliales colorrectales circulantes en sangre extraída de la vena porta es significativamente más frecuente en pacientes con tumores hipervascularizados que en pacientes con tumores hipovascularizados⁵⁹.

Por otra parte, el grado de expresión de VEGF se asocia también con una mayor progresión tumoral y un peor pronóstico ⁹². En pacientes con CCR, los valores séricos de VEGF están elevados ^{93, 94} y muestran una correlación significativa con un menor tiempo libre de enfermedad y una menor supervivencia ^{95 96-98}.

Los niveles de VEGF están elevados en todos los estadios de la secuencia adenoma-adenocarcinoma. Sin embargo, la mayor diferencia se ha observado entre los estadios Tis y T1 ⁹⁹. Estos resultados sugieren que el interruptor angiogénico se activa precozmente en el desarrollo tumoral (Figura 5).

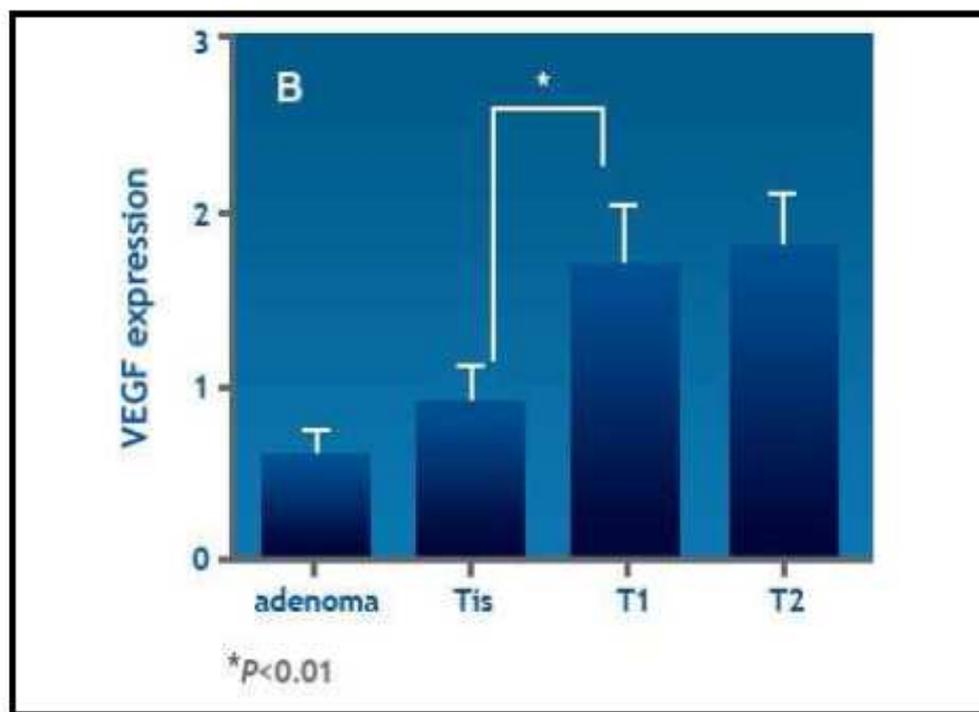


Figura 5: Expresión de VEGF en función de estadio tumoral:

La intensidad de la tinción para VEGF en las células tumorales se graduó en una escala del 0 al 3, donde 0 representaba tinción indetectable y 3 la mayor cantidad de tinción en el margen invasivo. La tinción con VEGF y la densidad vascular se analizaron en adenomas, Tis, T1 y T2. Adaptado Takahashi 2003 ⁹⁹

Se ha sugerido además que las isoformas VEGF-A y VEGF-B están relacionadas con el desarrollo tumoral inicial en el estado de adenoma y que la isoforma VEGF-C tiene mayor importancia en la enfermedad avanzada y el desarrollo de metástasis ^{73, 100}.

Estudios *in vitro* y modelos preclínicos también confirman la importancia del VEGF y la angiogénesis en la progresión del CCR. Se ha demostrado que el VEGF estimula la angiogénesis en líneas celulares de cáncer de colon acelerando el crecimiento celular y el desarrollo de metástasis ^{58, 101-103}.

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

1.4.2.1 Calidad de la cirugía

Exéresis total del mesorrecto (ETM)

Desde hace ya varios años, la exéresis total del mesorrecto (ETM) es la técnica de elección en el tratamiento quirúrgico del cáncer de recto. La técnica de la ETM, que hemos descrito anteriormente, fue introducida por Heald ¹⁰ y sus colaboradores en 1982 con el fin de disminuir los elevados porcentajes de recurrencia local tras la resección anterior en pacientes con cáncer de recto. La obtención de un margen circunferencial libre tras una adecuada ETM es incluso más importante que la integridad de la fascia mesorrectal. Un porcentaje importante de las recurrencias locales es por afectación de este margen circunferencial. Se considera que el margen circunferencial está afectado cuando la distancia del tumor al mismo es igual o menor de 1 mm. Con la introducción de la técnica de la ETM y del tratamiento neoadyuvante se ha disminuido de forma considerable la afectación de este margen radial y consecuentemente la recidiva local. La afectación de este margen radial es un factor pronóstico muy importante no sólo en las recidivas locales, sino también en las metástasis a distancia y consecuentemente en la supervivencia de estos pacientes ¹⁰⁴.

Exéresis total del mesocolon

En las últimas dos décadas se ha producido un importante progreso en la cirugía del cáncer de recto, tal y como hemos comentado en el apartado anterior. En cambio, en

la cirugía del cáncer de colon apenas ha habido modificaciones en los criterios de la resección estándar del mismo¹⁰⁵. Aparentemente esta cirugía se realiza de forma semejante por todos los cirujanos; sin embargo existen diferentes estudios que demuestran una notable variabilidad en la tasa de recidivas locales con cifras dispares del 2,4% hasta 18%¹⁰⁶, que sugieren que el factor cirujano también es una variable pronóstica independiente en el cáncer de colon.

La estandarización de la técnica de resección según los planos embriológicos del colon ha demostrado tener un valor pronóstico¹⁰⁷. En un estudio retrospectivo, West et al.¹⁰⁸ evidenció deficiencias quirúrgicas considerables en el plano de resección de las piezas auditadas que ponen de manifiesto la variabilidad del cirujano. Así, solo el 32% de resecciones habían sido practicadas en el plano correcto del mesocolon y hasta 24% se realizaron en el plano de la muscular propia teniendo un impacto pronóstico adverso sobre la supervivencia, especialmente en estadios III. Por todo ello, Hohenberger et al.¹⁰⁹ proponen una cirugía similar a la realizada en la exéresis total del mesorrecto, ya que también existen planos embriológicos parecidos en el colon, proponiendo una cirugía radical basada en los conceptos de la denominada exéresis completa del mesocolon (CME) con la ligadura central de los pedículos vasculares.

La técnica del CME consiste en la exéresis completa del mesocolon a través de una disección meticulosa de los planos embriológicos que incluye todas las posibles rutas metastásicas tumorales con la ligadura central y en el origen de los pedículos vasculares¹⁰⁹.

En este tipo de cirugía el tamaño del mesocolon resecado es mayor a la técnica habitual, por lo que obviamente, también lo es el número de ganglios resecados; todo ello podría explicar los mejores resultados observados en cuanto a la tasa de supervivencia a los 5 años en estos pacientes¹⁰⁸. Probablemente, la mayor resección

de mesocolon y consecuentemente de ganglios resecaados permite una mejor y más precisa estadificación tumoral. Es decir, tumores inicialmente estadio II en la cirugía habitual se convertirían en estadios III que recibirían tratamiento adyuvante, lo que explicaría la mayor supervivencia a los 5 años observada en este tipo de cirugía sobretodo en dicho estadio ¹¹⁰. Se conseguiría por una parte una mejor estadificación tumoral y por otra una mejor y más amplia resección. El estudio de Leeds ¹⁰⁸ pone de manifiesto que la cirugía potencialmente curativa realizada en estadios III mediante la técnica de CME mostraba una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 58% respecto al 35% observada en la cirugía que se realizó en el plano de la muscularis propia. Sin embargo, actualmente no podemos predecir, con las pruebas de imagen actuales, el número de ganglios afectos y por tanto aquellos pacientes que se beneficiarían de este tipo de resección, ya que al tratarse de una cirugía radical con mayor extensión en la resección no está absenta de una mayor morbilidad y mortalidad ^{109, 111}.

1.4.2.2. Respuesta inflamatoria y angiogénica a la cirugía

Respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica

El traumatismo quirúrgico induce una respuesta inflamatoria sistémica y local y unas alteraciones en las funciones metabólica e inmunitaria, que se caracterizan por un aumento del metabolismo y un estado generalizado de inmunodepresión. Las citoquinas, polipéptidos solubles producidos principalmente por células del sistema inmunitario pero también por otros tejidos, actúan como mediadores de esta respuesta inflamatoria por un mecanismo paracrino o endocrino ¹¹². En los últimos años se han descrito multitud de estos mediadores con muy variados efectos biológicos. Las citoquinas intervienen en la regulación de la respuesta inmunológica y actúan por varias vías sobre los linfocitos T, los linfocitos B, los monocitos y los macrófagos, los neutrófilos, los fibroblastos, las fibras de músculo liso y las células endoteliales.

La respuesta inflamatoria local se inicia con la producción de citoquinas quimiotácticas por el endotelio vascular y los fibroblastos adyacentes que consiguen que en los primeros 30 y 60 minutos los neutrófilos marginales se acumulen en el lugar de la agresión. Estos neutrófilos realizan funciones de fagocitosis inespecífica y liberan oxidantes, proteinasas y citoquinas que consiguen que, en las 4 ó 5 horas siguientes, acudan al foco traumático los monocitos y linfocitos. Estos últimos continúan la respuesta inflamatoria local y posteriormente la sistémica como veremos a continuación. En el peritoneo, la respuesta inflamatoria se inicia a partir de las células peritoneales mesoteliales, los fibroblastos, los macrófagos y los leucocitos ^{113, 114}.

Interleuquinas proinflamatorias

A finales de los setenta, la nomenclatura de estos mediadores sufrió una serie de cambios ya que se demostró no sólo que varias citoquinas tenían la misma función sino que una única citoquina formaba parte de varios procesos biológicos. Por ello se denominaron interleuquinas a aquellas citoquinas cuya función principal era la señalización entre leucocitos ¹¹⁵.

Hasta el momento se han descrito más de 150 citoquinas diferentes cuya clasificación, según sus efectos, es difícil ya que se ha demostrado el carácter pleiotrófico de muchas de ellas. En conjunto, las citoquinas pueden agruparse en proinflamatorias y antiinflamatorias. Una de las citoquinas que desempeñan un papel más importante en la respuesta inflamatoria es la IL-6, mencionada anteriormente al hablar de la respuesta inflamatoria tumoral.

Interleuquina-6 (IL-6)

Es una citoquina proinflamatoria que desencadena la síntesis de las principales proteínas de fase aguda cuyos niveles están aumentados tanto en procesos

infecciosos como inflamatorios. La IL-6, inicialmente llamada factor estimulante de hepatocitos (HSF), es la principal responsable de la respuesta de fase aguda hepática¹¹⁶⁻¹¹⁸. Esta respuesta corresponde en realidad a un conjunto de respuestas homeostáticas inducidas por el daño tisular o la infección. Siguiendo estos estímulos, se desarrollan en las horas siguientes a la agresión distintos cambios fisiológicos que incluyen alteraciones en la termorregulación (aumento de la temperatura), en el balance nitrogenado (estado catabólico) y cambios en los niveles circulantes de un grupo de proteínas clásicamente denominadas proteínas de fase aguda. Estas proteínas han demostrado ser útiles en la cuantificación de la respuesta inflamatoria y entre ellas destacan el amiloide A y P, la albúmina sérica que se considera una proteína de fase aguda negativa porque desciende en los procesos inflamatorios y la PCR, que participa en la neutralización de antígenos y en procesos reparativos además de favorecer la fagocitosis y la quimiotaxis (Figura 6).

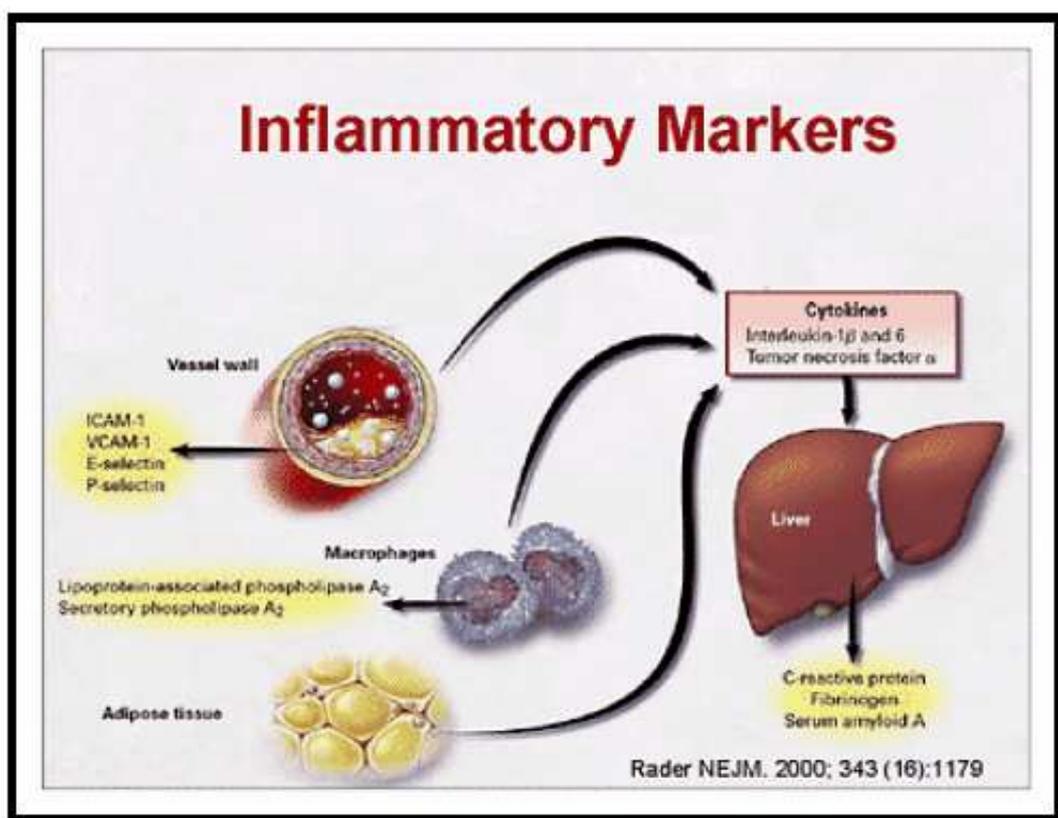


Figura 6. Marcadores de la inflamación.

La mayoría de las células nucleadas tienen capacidad de expresar IL-6 *in vitro*. *In vivo* se ha demostrado que la principal fuente de producción de IL-6 son los monocitos y los macrófagos así como las células estromales, sobre todo los fibroblastos, las células epiteliales y las células endoteliales¹¹⁹⁻¹²¹. Estudios *in vitro* han demostrado que la IL-6 puede ser expresada también por células del sistema nervioso central^{122, 123}.

La expresión de IL-6 está estimulada por otras citoquinas y factores de crecimiento así como también por las endotoxinas bacterianas. En los monocitos y macrófagos el lipopolisacárido es el estímulo más potente para la producción de IL-6. A su vez, el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 1 (IL-1) son los más potentes estimuladores para la producción fibroblástica de IL-6^{119, 124, 125}. Otros factores estimuladores de la producción de IL-6 son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF)¹¹⁹.

Los niveles séricos de IL-6 constituyen un marcador precoz y selectivo del daño tisular puesto que se elevan en proporción con la intensidad del traumatismo quirúrgico. Algunos autores han determinado los valores de las citoquinas plasmáticas IL-6, IL-1, TNF α e IFN- γ en el periodo perioperatorio^{112, 126}. Estos niveles aumentan inmediatamente después de la cirugía hasta alcanzar un pico máximo a las 4-6 horas y posteriormente descienden hasta alcanzar los niveles basales a las 48 horas de la intervención¹²⁷⁻¹²⁹. Algunos estudios han demostrado esta misma curva en la respuesta inflamatoria local determinada a través de la cuantificación de IL-6 en líquido peritoneal¹³⁰ y en la herida quirúrgica^{131, 132}.

Dado que la agresión quirúrgica es menor cuando se utilizan técnicas mínimamente invasivas, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria y la activación de las citoquinas son menos intensas en pacientes intervenidos por laparoscopia. Así lo han

demostrado varios estudios experimentales y clínicos que han comparado ambas técnicas quirúrgicas^{127, 129, 133, 134}. Nuestro grupo ha estudiado la respuesta inflamatoria en un modelo animal de cáncer de colon confirmando que los valores séricos de IL-6 alcanzan un pico máximo 6 horas después de la intervención quirúrgica tanto en el grupo de cirugía abierta como en el de cirugía laparoscópica. Cuando se compararon los valores de IL-6 entre los dos grupos, se observó que fueron significativamente más elevados en el grupo de cirugía abierta¹³⁵. Posteriormente hemos confirmado también estas diferencias en la respuesta inflamatoria postoperatoria entre cirugía abierta y laparoscópica en un ensayo clínico aleatorizado¹³⁶.

Se ha sugerido que la intensidad de la respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica puede tener valor pronóstico y estar relacionada con la recurrencia tumoral^{50, 137, 138} tal y como ocurre con la respuesta inflamatoria inducida por el propio tumor y que hemos mencionado anteriormente^{100, 102}. En un estudio prospectivo en el que se incluyeron 36 pacientes con CCR intervenidos con intención curativa de forma consecutiva se investigó la respuesta inflamatoria de fase aguda hasta 4 meses después de la cirugía⁵⁰. Los autores observaron que el porcentaje de recurrencia tumoral fue significativamente más elevado en aquellos pacientes que presentaban una respuesta de fase aguda persistente más allá de los 24 meses tras la resección del tumor. Otros autores sin embargo, no han confirmado estos hallazgos¹³⁹.

Respuesta angiogénica a la cirugía

A diferencia de la gran cantidad de estudios dedicados a la respuesta inflamatoria postoperatoria, pocos autores han investigado las modificaciones que tienen lugar en la expresión de citoquinas proangiogénicas tras un traumatismo quirúrgico. Bondestam et al.¹⁴⁰ observaron un aumento de los niveles séricos de VEGF durante la primera semana del postoperatorio en un grupo de 18 pacientes intervenidos de aneurisma de

aorta abdominal o *by-pass* aortocoronario. En otro estudio, los niveles de VEGF en suero fueron significativamente más elevados en un grupo de pacientes intervenidos por una fractura de cuello de fémur en comparación con controles sanos, apareados por sexo y edad¹⁴¹. Esta elevación postoperatoria del VEGF refleja la activación del fenómeno de la angiogénesis como parte del proceso de curación de las heridas y varios estudios más recientes han demostrado que también tiene lugar en pacientes intervenidos de cáncer. Wu et al.^{130, 142} estudiaron los efectos de la cirugía sobre el perfil de citoquinas proangiogénicas en un grupo de 16 pacientes intervenidos de CCR con intención curativa y en todos ellos se observó una elevación del VEGF en suero.

Estudios posteriores han confirmado el incremento en los niveles séricos de VEGF secundario al traumatismo quirúrgico y han demostrado además que dicha elevación es más prominente en aquellas intervenciones quirúrgicas en las que se produce un mayor grado de agresión. Curigliano et al.¹⁴³ investigaron los niveles en suero de VEGF en un grupo de 82 pacientes consecutivas con cáncer de mama. Los autores observaron un mayor aumento en el 5º día del periodo postoperatorio en aquellas pacientes a las que se les había practicado una mastectomía radical seguida de reconstrucción con el músculo recto del abdomen en comparación con aquellas a las que se les había realizado una mastectomía sin reconstrucción o una cuadrantectomía. Futami et al.¹⁴⁴, evaluaron los cambios en la concentración de VEGF en suero en 41 pacientes con cáncer de esófago a los que se les practicó una esofagectomía transtorácica con linfadenectomía extensa y en 13 pacientes a los que se les hizo un procedimiento menos agresivo, una colecistectomía. Los niveles postoperatorios de VEGF se incrementaron en los dos grupos aunque el aumento en el grupo de la esofagectomía fue el doble que en el grupo de la colecistectomía en el día 14 del curso postoperatorio.

De la misma forma se han observado estas diferencias en la respuesta angiogénica postoperatoria entre cirugía abierta y laparoscópica^{136, 145 146}. En el ensayo clínico realizado por nuestro grupo, mencionado anteriormente, observamos que los niveles de VEGF tanto en suero como en líquido peritoneal fueron significativamente mayores en el grupo de cirugía abierta¹³⁶.

La activación del denominado interruptor angiogénico durante el postoperatorio inmediato forma parte de la respuesta biológica a la agresión quirúrgica. Sin embargo esta activación podría tener un efecto perjudicial en pacientes intervenidos de cáncer, especialmente cuando se ha demostrado que la elevación postoperatoria de los niveles de VEGF en dichos pacientes es mayor en comparación con pacientes intervenidos por patología benigna con un grado de agresión similar²⁸⁵. Varios estudios han demostrado la presencia de células tumorales viables en el lecho quirúrgico¹⁴⁷, en sangre venosa²⁸² y en la propia luz intestinal²⁸³ así como “metástasis durmientes” en un estado preangiogénico²⁸⁴ que, en presencia de un estímulo angiogénico suficientemente intenso y prolongado durante el periodo postoperatorio, podrían dar lugar a un tumor vascularizado y en consecuencia a una recurrencia local o a distancia.

Debemos preguntarnos entonces si la magnitud de la respuesta angiogénica durante el periodo postoperatorio es un factor pronóstico de recurrencia en pacientes con cáncer. Los resultados de varios estudios sugieren que es así. En el estudio experimental realizado por nuestro grupo en un modelo de cáncer de colon observamos que la recurrencia tumoral fue mayor en aquellos ratones que presentaban una mayor concentración de VEGF en suero durante el postoperatorio y que habían sido intervenidos mediante una laparotomía en comparación con el grupo de ratones que habían sido intervenidos por laparoscopia¹³⁵. En un reciente estudio

clínico hemos observado también que la concentración de VEGF en suero determinada en los primeros días del postoperatorio es un factor pronóstico independiente de recurrencia junto con la afectación ganglionar¹⁴⁸

1.4.2.3 Complicaciones de la cirugía: asociación entre la dehiscencia de anastomosis y la recurrencia tumoral.

La cirugía del cáncer de colon y recto se asocia a una elevada morbilidad que oscila entre el 30% y el 40 % y que incluye tanto complicaciones médicas como otras directamente relacionadas con la técnica quirúrgica¹⁴⁹. Muchas de estas complicaciones están directamente relacionadas con la necesidad de restablecer la continuidad intestinal tras la resección segmentaria del colon o del recto. La hemorragia originada en la anastomosis es poco frecuente, oscila entre el 0,5 y 1%^{11, 150} y no existen diferencias entre suturas mecánicas o manuales. Es una complicación que tiene lugar en el postoperatorio inmediato y en la mayoría de los casos se resuelve de forma espontánea. La estenosis de la anastomosis es una complicación tardía, incluso meses después de la cirugía, y menos frecuente que la hemorragia. Sin duda, la complicación más importante en la cirugía del CCR es la dehiscencia de la anastomosis y la consiguiente infección peritoneal. La incidencia varía en diferentes series entre un 0,5 y un 30%, dependiendo de la localización del tumor y de la definición de dehiscencia¹⁵¹. Esta complicación es más frecuente tras la cirugía del cáncer de recto, donde puede alcanzar un rango entre el 8 y el 20%, y se asocia a una elevada morbilidad y mortalidad¹⁵².

Se han asociado varios factores a un mayor riesgo de dehiscencia de la anastomosis, algunos relacionados con la técnica quirúrgica y otros intrínsecos del propio paciente. Los factores de riesgo técnicos más destacados son la isquemia y la tensión de la anastomosis, las dificultades técnicas intraoperatorias y la realización de una

anastomosis próxima al margen anal. Entre factores intrínsecos más importantes destacan la anemia, la malnutrición, la corticoterapia, la radioterapia preoperatoria, la transfusión sanguínea, las condiciones sépticas intraoperatorias, la inflamación activa intestinal y las comorbilidades del paciente^{153, 154}.

Varios estudios de cohortes y casos-contróles publicados en los últimos años sugieren que la dehiscencia de la anastomosis y la consiguiente infección peritoneal se asocian con porcentajes más elevados de recurrencia y con una mayor mortalidad relacionada con el cáncer¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. En un estudio sobre 1722 pacientes intervenidos de forma consecutiva de CCR se observó que la supervivencia global a los 5 años en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia fue del 45% en comparación con un 64% en aquellos en los que no ocurrió esta complicación¹⁵⁵. Además, la dehiscencia de anastomosis presentó una asociación independiente negativa con la supervivencia relacionada con el cáncer. Ptok et al.¹⁵⁸ encontraron que aquellos pacientes con una dehiscencia que precisaron tratamiento quirúrgico tenían un porcentaje de recurrencia local a los 5 años mayor y una supervivencia libre de enfermedad menor que los pacientes sin dehiscencia en una serie de 1741 pacientes intervenidos por cáncer de recto. Un reciente meta-análisis que evaluó la recurrencia y la supervivencia relacionada con el cáncer en 21.902 pacientes intervenidos con CCR mostró que la infección peritoneal era un factor pronóstico negativo de recurrencia local y se asociaba a una menor supervivencia relacionada con el cáncer¹⁵⁹.

Aunque no confirmada por otros autores¹⁶⁰⁻¹⁶³, son numerosos los estudios que han demostrado la influencia de la dehiscencia de anastomosis y peritonitis sobre el resultado oncológico. Se ha sugerido incluso que la influencia negativa sobre el resultado oncológico a largo plazo no se limita a las infecciones peritoneales sino que incluye también otras complicaciones infecciosas¹⁶⁴ y no infecciosas^{165, 166} después de

diferentes intervenciones en pacientes con cáncer gastrointestinal. Aunque la mayoría de los estudios que apoyan esta asociación han sido publicados en los últimos años, es interesante destacar como ya en 1983 Nowacki y Szymendera observaron que la fiebre postoperatoria que se prolongaba más de dos días era, junto con la afectación ganglionar, el factor pronóstico más desfavorable en una serie de 224 pacientes intervenidos por cáncer colorrectal¹⁶⁷.

Se han propuesto diferentes hipótesis con el fin de explicar los mecanismos responsables de la asociación entre dehiscencia de anastomosis, infección peritoneal y recurrencia. Se ha sugerido que la respuesta inflamatoria, mayor en pacientes con una infección postoperatoria, inactiva la apoptosis favoreciendo la proliferación de células tumorales implantadas y de metástasis ocultas¹⁵⁵. Otros investigadores han sugerido que la dehiscencia podría favorecer la implantación de células exfoliadas depositadas fuera de la luz intestinal en la pelvis¹⁵⁶. Sin embargo, estas hipótesis no han sido demostradas por lo que deberían ser investigados otros factores implicados en el crecimiento tumoral.

Como hemos comentado anteriormente, un componente esencial para la recurrencia tumoral y el desarrollo de metástasis es la angiogénesis y el VEGF es la principal citoquina proangiogénica. Se ha observado que un aumento de la angiogénesis y valores elevados de VEGF en el suero se asocian con un menor tiempo libre de enfermedad y una menor supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal¹⁶⁸. También hemos mencionado que uno de los principales inductores de la angiogénesis es la respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica. Así, hemos demostrado anteriormente que una respuesta inflamatoria postoperatoria aumentada se asocia a una mayor angiogénesis y un mayor crecimiento tumoral tras la resección de un cáncer de colon en ratones¹³⁵. Esta respuesta inflamatoria se incrementa todavía más

en presencia de una infección peritoneal. De esta forma, aunque la activación de la angiogénesis durante el postoperatorio debe ser considerada como parte del proceso de curación de las heridas, una respuesta amplificada podría tener un efecto negativo en pacientes con cáncer.

Con el fin de estudiar la asociación entre dehiscencia de anastomosis, inflamación, angiogénesis y recurrencia tumoral, hemos utilizado un modelo experimental combinado de cáncer de colon e infección peritoneal. En dicho estudio no sólo hemos observado que la infección postoperatoria induce una mayor recurrencia tumoral sino que también se asocia a una mayor angiogénesis y expresión de VEGF. En el diseño del estudio incluimos un total de 70 ratones (Balb/c) y les indujimos un tumor sólido en el colon inyectando células tumorales singénicas de la línea B51LiM en la serosa del ciego¹⁶⁹. Posteriormente randomizamos a los animales en dos grupos: aquellos en los que se les realizó una cequectomía sin infección intraabdominal postoperatoria (grupo 1) y una cequectomía con infección intraabdominal postoperatoria (grupo 2). La cequectomía se realizó a los 12 días de la inyección de las células neoplásicas en el ciego. La infección intraabdominal en el grupo 2 se indujo mediante inyección intraperitoneal de 3×10^8 unidades formadoras de colonias de *B. fragilis* inmediatamente después de la cequectomía. Se tomaron muestras de sangre de los ratones en el momento de la resección cecal, a las 48h y a los 12 días momento que corresponde al sacrificio del animal. En estas muestras de sangre se determinó el VEGF mediante la técnica de ELISA. Se evaluó el crecimiento tumoral en los dos grupos mediante un sistema de puntuación y se calculó además el peso de la carga tumoral total. Además se evaluó la angiogénesis en la recurrencia tumoral mediante técnicas de inmunohistoquímica para determinar la densidad microvascular. Comparando los dos grupos del estudio, la recurrencia tumoral fue más frecuente en los animales que presentaron una infección peritoneal postoperatoria (grupo 1: 65% vs

grupo 2: 100%; $p=0.02$), y el peso tumoral total fue también mayor en los animales con infección (grupo 1: 0.5 ± 0.8 vs grupo 2: 1.2 ± 1.1 g; $p=0.04$). Además, los niveles en suero de VEGF fueron mayores en el momento del sacrificio en el grupo con infección postoperatoria (grupo 1: 11 ± 10 vs. grupo 2: 22 ± 25 pg/ml; $p<0.05$). Finalmente, la angiogénesis tumoral también fue mayor en el grupo de animales con infección intraabdominal (Densidad microvascular grupo 1: 16 ± 7 vs grupo 2: 28 ± 11 vasos por campo; $p<0.05$). Con estos resultados concluimos que la infección peritoneal postoperatoria aumenta la recurrencia tumoral tras la resección de un cáncer de colon en ratones y que un aumento de la angiogénesis podría ser uno de los mecanismos implicados ¹⁷⁰.

Con el objetivo de investigar si los pacientes intervenidos de CCR que tienen una infección peritoneal postoperatoria presentan también una mayor respuesta inflamatoria y angiogénica, que pudiera explicar la mayor recurrencia tumoral observada en estudios previos, diseñamos el presente proyecto de investigación

2. HIPÓTESIS

La hipótesis del presente proyecto de investigación propone que los pacientes intervenidos de CCR que presentan una infección peritoneal en el postoperatorio desarrollan una mayor respuesta inflamatoria y angiogénica en comparación con aquellos pacientes que tienen un curso postoperatorio sin complicaciones.

Esta amplificación de la inflamación y de la angiogénesis durante el periodo postoperatorio inmediato podría explicar, al menos en parte, el mayor porcentaje de recurrencia tumoral observado en aquellos pacientes que presentan una infección peritoneal tras la resección del tumor.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la respuesta inflamatoria y la respuesta angiogénica en los pacientes con CCR a los que se les practica una resección con intención curativa, y comparar los resultados entre un grupo de pacientes que ha presentado una infección peritoneal postoperatoria y otro grupo de pacientes que no ha presentado ninguna complicación en el postoperatorio.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión en suero y en el líquido peritoneal de la citoquina proinflamatoria IL-6 en pacientes sometidos a una resección de un CCR con intención curativa y comparar los resultados de los pacientes que presentaron una infección en el postoperatorio con los de aquellos que no presentaron ninguna complicación.
- Determinar la expresión en suero y en el líquido peritoneal de la citoquina angiogénica VEGF en pacientes intervenidos de CCR con intención curativa y comparar los resultados de los pacientes que presentaron una infección peritoneal postoperatoria con los de aquellos que no presentaron ningún tipo de complicación.
- Correlacionar la intensidad de la respuesta inflamatoria postoperatoria con la expresión de VEGF.
- Identificar, mediante técnicas de microarrays de DNA, otros posibles mediadores implicados en la respuesta inflamatoria y angiogénica a la agresión quirúrgica en pacientes operados de CCR con y sin infección peritoneal.

- Comparar la recurrencia tumoral entre los pacientes intervenidos de CCR que presentaron infección peritoneal en comparación con aquellos que no presentaron ninguna infección.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

Estudio prospectivo de cohortes con controles apareados.

4.2. Sujetos del estudio

4.2.1. Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados de CCR ingresados en la Unidad de Cirugía Colorrectal del Hospital del Mar a los que se les va a practicar una resección quirúrgica electiva con intención curativa.

4.2.2. Criterios de exclusión

- Pacientes con metástasis a distancia.
- Pacientes a los que se les realicen otros procedimientos quirúrgicos de forma sincrónica además de la resección de colon.
- Pacientes que precisan cirugía urgente.
- Pacientes en los que no es posible la resección curativa del tumor.
- Ausencia de consentimiento informado.

4.2.3. Grupos de estudio

Se incluyeron en el estudio todos aquellos pacientes diagnosticados de CCR que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión. Aquellos que presentaron una infección peritoneal durante el postoperatorio, ya sea en forma de absceso intraabdominal o peritonitis secundaria a una dehiscencia de anastomosis, se incluyeron en el grupo infección. Cada uno de los pacientes del grupo infección fue

apareado con un paciente con un curso postoperatorio sin complicaciones según sexo, edad \pm 5 años, procedimiento quirúrgico, tipo de abordaje y estadio tumoral. Estos pacientes constituyeron el grupo control.

4.3. Técnica quirúrgica

La resección de colon y recto fue realizada según la técnica habitual en nuestro centro: hemicolectomía derecha con anastomosis mecánica latero-lateral en pacientes con neoplasias de ciego, colon ascendente y ángulo hepático; hemicolectomía izquierda en pacientes con neoplasias en colon descendente y ángulo esplénico; sigmoidectomía o resección anterior de recto en neoplasias de sigma y resección anterior o resección anterior baja en neoplasias de recto. En las resecciones de colon izquierdo o recto se realizó una anastomosis término-terminal mecánica según la técnica del doble grapado. En aquellos pacientes en los que se realizó una resección anterior baja con una anastomosis a menos de 7 cm se realizó además una ileostomía derivativa. En pacientes con neoplasias de recto inferior que infiltraban el elevador del ano o el sistema esfinteriano se realizó una amputación abdominoperineal de Miles. El abordaje quirúrgico fue abierto mediante laparotomía media o laparoscópico dependiendo del cirujano y de las características del paciente y del tumor. Todas las intervenciones fueron realizadas por los miembros de la Unidad de Cirugía Colorrectal.

En todos los casos se dejó un drenaje aspirativo de baja presión tipo Blake (drenaje de silicona de 15 Fr. redondo con reservorio J-VAC de 100cc de Johnson & Johnson, España) en el lecho quirúrgico al finalizar la intervención para la obtención de muestras de líquido peritoneal durante el periodo postoperatorio.

4.4. Cuidados perioperatorios

Los cuidados perioperatorios se realizaron de acuerdo con el programa de rehabilitación multimodal instaurado en la Unidad de Cirugía Colorrectal^{171, 172}, cuyos aspectos más destacados son los siguientes:

- Fase preoperatoria: información oral y escrita por parte del cirujano responsable y de enfermería en consultas externas. Los pacientes ingresan el día anterior a la intervención momento en el que se les administra una solución hidrocarbonada (135 g de carbohidratos en 1000 cc) en forma de nutrición enteral (Edanec®) e hidratación oral hasta 6 h antes de la intervención. La preparación mecánica del colon se realiza con polietilenglicol.
- Fase intraoperatoria: Administración de antibioticoterapia profiláctica con dosis única de gentamicina 240 mg y metronidazol 2 gr. Uso de anestésicos de acción corta. Hidratación ajustada con reposición de pérdidas hemáticas y pérdidas insensibles ajustadas a 6-8 ml/kg/h. Administración de sueroterapia a temperatura controlada y uso de manta térmica.
- Fase postoperatoria: Analgesia postoperatoria con catéter epidural durante 48h. Dieta progresiva a partir de 4-6h tras la cirugía. Retirada de sueroterapia cuando el paciente tolera ingesta líquida. Movilización precoz.

El drenaje aspirativo se retiró al cuarto día del postoperatorio una vez tomadas las muestras correspondientes. En ausencia de complicaciones los pacientes fueron dados de alta entre el cuarto y el sexto día del postoperatorio con una correcta tolerancia a la dieta sólida, dolor controlado con analgesia oral y buena movilización.

4.5. Variables y recogida de datos

De todos los pacientes se recogieron las siguientes variables:

- Características demográficas:
 - Edad
 - Sexo
- Datos de la intervención quirúrgica:
 - Localización del tumor:
 - Colon derecho
 - Colon transverso
 - Colon izquierdo
 - Colon Sigmoides
 - Recto
 - Tipo de intervención quirúrgica
 - Vía de abordaje
 - Conversión a cirugía abierta
 - Tiempo quirúrgico
 - Necesidad de transfusión perioperatoria
- Características histopatológicas del tumor:
 - Tipo histológico
 - Grado de diferenciación tumoral
 - Invasión linfoscavular
 - Número de ganglios aislados y número de ganglios afectados
 - Estadío Tumoral
- Datos del Postoperatorio y Complicaciones:
 - Estancia postoperatoria

- Reintervención
 - Reingreso
 - Morbilidad
 - Tipo de complicación
 - Tratamiento de la complicación
- Tratamiento neoadyuvante y/o adyuvante

 - Datos de la recurrencia tumoral:
 - Seguimiento
 - Recurrencia tumoral local
 - Recurrencia tumoral a distancia
 - Fecha de diagnóstico de recurrencia
 - Mortalidad relacionada o no con el cáncer

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

Definimos la dehiscencia de anastomosis como aquella complicación debida a una fuga de contenido intestinal a través de la anastomosis, que generalmente ocurre entre el cuarto y séptimo día de la intervención quirúrgica, produciendo secundariamente una peritonitis generalizada o localizada y con repercusión clínica en forma de sepsis. Su diagnóstico es clínico y radiológico mediante la realización de una tomografía axial computerizada (TAC) y la administración simultánea de un enema con contraste hidrosoluble (Gastrografin®). Su tratamiento precisa en la mayoría de los casos una reintervención quirúrgica. Definimos absceso como una colección intraabdominal asociado a fiebre y/o leucocitosis, con cultivo positivo y que precisó tratamiento con antibióticos y drenaje percutáneo.

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

4.7.1. Muestras de sangre

Se obtuvo una muestra de 10 cc de sangre momentos antes de la intervención quirúrgica, a las 48 horas y al cuarto día del postoperatorio o el día de la infección peritoneal. Se centrifugó la sangre (Centrifugadora Eppendorf, Modelo 5702, Hamburgo, Alemania), una vez coagulada, a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a -4°C y el suero obtenido fue congelado para su almacenamiento a -80°C y posterior análisis.

4.7.2. Muestras de líquido peritoneal

Inmediatamente después de la laparotomía, o tras la introducción de los trócares en los pacientes intervenidos por laparoscopia, se realizó un lavado peritoneal con 100 cc de suero fisiológico y se obtuvo una muestra de 20 cc después de 5 minutos. Se obtuvieron muestras de 20 cc de líquido peritoneal a través del drenaje a las 48 horas y al cuarto día del postoperatorio o en el momento de la infección peritoneal. Las muestras se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a -4°C . El líquido resultante fue congelado a -80°C hasta su análisis.

4.7.3. Determinaciones de citoquinas en las muestras de suero y líquido peritoneal

La concentración sérica y en el líquido peritoneal de la citoquina proinflamatoria IL-6 y del factor angiogénico VEGF se determinó mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) con un kit comercial, en placa de microtiter, con anticuerpos unidos a los pocillos (Quantikine Human IL-6 y Human VEGF Quantikine Elisa Kit, R & D Systems, Minneapolis, EEUU).

El proceso emplea la técnica cuantitativa del inmunoensayo enzimático en *sandwich*, en el que se ha fijado previamente en el fondo de un pocillo un anticuerpo monoclonal específico para la IL-6 o VEGF. La curva de estándares y las muestras son pipeteadas dentro de los pocillos y la IL-6 o VEGF presente en las mismas se fijan e inmovilizan por el anticuerpo. Tras el lavado exhaustivo se eliminan las sustancias sobrenadantes y se añade un anticuerpo policlonal específico que va unido a una enzima con un colorante. Posteriormente a un nuevo lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido se añade la solución sustrato a los pocillos y se obtiene una cantidad de color proporcional a la cantidad de IL-6 o VEGF que se ha fijado en el paso inicial. Lo que finalmente se mide es la intensidad del color con un lector de ELISA a una λ de 490nm.

4.7.4. Microarrays de DNA

Con el fin de poder identificar otros mediadores implicados en la respuesta inflamatoria y angiogénica se procedió a realizar un análisis comparativo de la expresión diferencial de genes mediante un estudio de microarrays de DNA.

El microarray que se ha utilizado ha sido el GeneChip Human Gene 1.0 ST, de Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) ¹⁷³. Este array, con casi un millón de sondas y aproximadamente 26 sondas por gen, permite interrogar la expresión del genoma completo, tanto a nivel génico como a nivel exónico, para aquellos genes más representados.

La extracción del ARN total de la muestra se ha realizado a partir de los leucocitos aislados de la de sangre total utilizando el kit Leucolock®, según el protocolo de la casa comercial. Se recogieron muestras de 10 ml de sangre en tubos con anticoagulante EDTA (ácido EtilenDiaminoTetraAcético) y se transfirieron directamente

a los filtros de LeukoLock®. En los filtros quedaban capturados sólo los leucocitos totales siendo eliminados el plasma, las plaquetas y la serie roja. Seguidamente se realizaba un lavado con PBS (*phosphate-buffered saline*) para eliminar los residuos de la serie roja y se estabilizaba el RNA de los leucocitos capturados con RNA*later* . Seguidamente se almacenaban los filtros a – 80°C hasta su análisis. Posteriormente a partir de los filtros almacenados se aislaba el RNA mediante RNA *binding beads* y se purificaba según el protocolo de Leucolock® obteniendo entre 10-20µg de RNA total. Se realizó un control de calidad del ARN extraído previo a su análisis. Este control de calidad consiste en cuantificar la muestra utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (el cual nos proporciona la concentración de la muestra y también valores indicadores de la pureza del ARN) y en realizar un análisis de integridad del ARN mediante el Bioanalyzer 2100 (el cual nos indica el grado de degradación de la muestra). Se seleccionaron aquellas muestras con elevada integridad (*RNA integrity number* (RIN)>7) y se procesaron utilizando los reactivos Ambion WT Expression Kit (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling Kit, para ser hibridada en el array Human Gene 1.0 ST de Affymetrix. De manera resumida el procesamiento de la muestra consiste en: a partir de 150 nanogramos de ARN se realiza un primer paso de síntesis de ADN complementario (cDNA) generando DNA de doble cadena (dsDNA), el cual es amplificado mediante una transcripción *in vitro* de 16 horas en la que obtenemos múltiples copias de ARN complementario (cRNA). El producto amplificado es purificado y posteriormente usado como molde para un segundo ciclo de síntesis de cDNA, en el que obtenemos DNA de cadena única (ssDNA). El RNA es hidrolizado y el ssDNA es purificado y finalmente fragmentado y marcado con biotina. Posteriormente, la muestra es hibridada en el microarray durante 16-18h a 45°C y 60 rpm en el horno de hibridación Affymetrix GeneChip® Oven 645. El día siguiente se realizan los lavados y tinción del array en la estación de fluidos Affymetrix GeneChip®

Fluidics.Station 450. Finalmente, el array es escaneado utilizando el escáner Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G, obteniendo los ficheros CEL a partir de los cuales se realizará el análisis de los datos. El análisis de microarrays se ha realizado en el Servicio de Microarrays del IMIM-Hospital del Mar.

Análisis de los datos de los microarrays de expresión

A partir de los datos de intensidad cruda, proporcionados por el software de análisis de imagen de los microarrays de Affymetrix, se procede al análisis estadístico de la expresión diferencial según las siguientes fases: a) Control de calidad de los datos. Se analizan los criterios de calidad habituales para la detección de arrays claramente erróneos. b) Normalización. Se estandarizan las intensidades de todos los microarrays mediante la metodología RMA (Robust Multichip Average)¹⁷³ para hacerlos comparables y eliminar diferencias sistemáticas. c) Filtrado no específico. Se eliminan aquellos genes cuya expresión permanece inalterable entre las condiciones en estudio. d) Análisis de la expresión diferencial. Se seleccionan los genes con mayores diferencias en expresión entre los grupos a comparar, mediante pruebas t de Student moderadas LIMMA¹⁷⁴. Para controlar la proporción de resultados falsos positivos se emplean técnicas estadísticas para comparaciones múltiples como el FDR¹⁷⁵. Los análisis estadísticos se realizan con el software específico de análisis de microarrays de uso público R con los paquetes de Bioconductor (<http://www.r-project.org/> <http://www.bioconductor.org>) y aroma.affymetrix. La selección de genes candidatos a validación posterior se realiza sobre la base de criterios estadísticos y biológicos.

4.8. Análisis estadístico

4.8.1. Tamaño de la muestra

En base a los resultados de estudios previos, asumiendo que la desviación estándar común es de 165 pg/ml para los dos grupos y aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un

riesgo beta de 0.20 en un contraste unilateral, se precisan 30 sujetos en el grupo de infección peritoneal y 30 en el grupo control para detectar una diferencia en los valores séricos de IL-6 igual o superior a 125 pg/ml. Con 12 pacientes por grupo, se debería detectar una diferencia en la concentración media en suero de VEGF de al menos 30 pg/dl, con una potencia del 80%, asumiendo una desviación estándar de 27 pg/dl. Por ello, el cálculo del tamaño de la muestra se ha basado en los niveles de IL-6.

4.8.2. Análisis de datos

Los valores se expresaron en forma de media +/- desviación estándar o mediana (rango intercuartil). Las variables cuantitativas se han comparado mediante la prueba de la T de Student o la prueba de la U de Mann-Whitney, en caso de que las variables no siguieran una distribución normal. Las variables cualitativas fueron comparadas entre los dos grupos utilizando el test de chi-cuadrado. Para valorar el grado de asociación entre variables, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y se aplicó la correlación de Spearman para las no paramétricas. Se consideró una $p < 0,05$ como estadísticamente significativa. Para el análisis de supervivencia se realizó mediante el análisis proporcional de Cox tanto para el estudio bivariante como el multivariante. Las variables que resultaron estadísticamente significativas en el análisis bivariante se introdujeron en el modelo multivariado. Seguidamente se iban extrayendo las variables que perdían su significación estadística con el objetivo de obtener el modelo final de predicción de recurrencia. Para la realización de las curvas de supervivencia se utilizó la prueba de Kaplan-Meier y la Log-Rank (Mantel-Haenzsel) para la comparación entre los dos grupos. Todos los cálculos se han realizado con el programa estadístico SPSS versión 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

4.9. Aspectos éticos

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

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

4.10. Aspectos de financiación

El presente estudio se ha realizado con la ayuda de una beca del Fondo de Investigación Sanitaria (ISCIII) concedida en el 2007 con un periodo de duración de tres años, con número de referencia PI060854 y como investigador principal el Dr. Miguel Pera.

5. RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes, el tumor y resultados del postoperatorio inmediato.

La figura 7 muestra el diagrama de flujo de los pacientes elegibles y de los que finalmente fueron incluidos en el estudio. Entre enero de 2008 y febrero de 2011 se intervinieron en nuestro hospital 280 pacientes de cáncer de colon que cumplían el criterio de inclusión y ninguno de los de exclusión. Treinta pacientes presentaron una infección peritoneal en el postoperatorio, dehiscencia de anastomosis en 20 casos y absceso intraabdominal en 10, constituyendo el grupo de infección. Los 30 pacientes del grupo control fueron seleccionados entre aquellos que no presentaron ningún tipo de complicación en el postoperatorio y apareados con los pacientes del grupo de infección de acuerdo con las variables descritas en la sección de métodos.

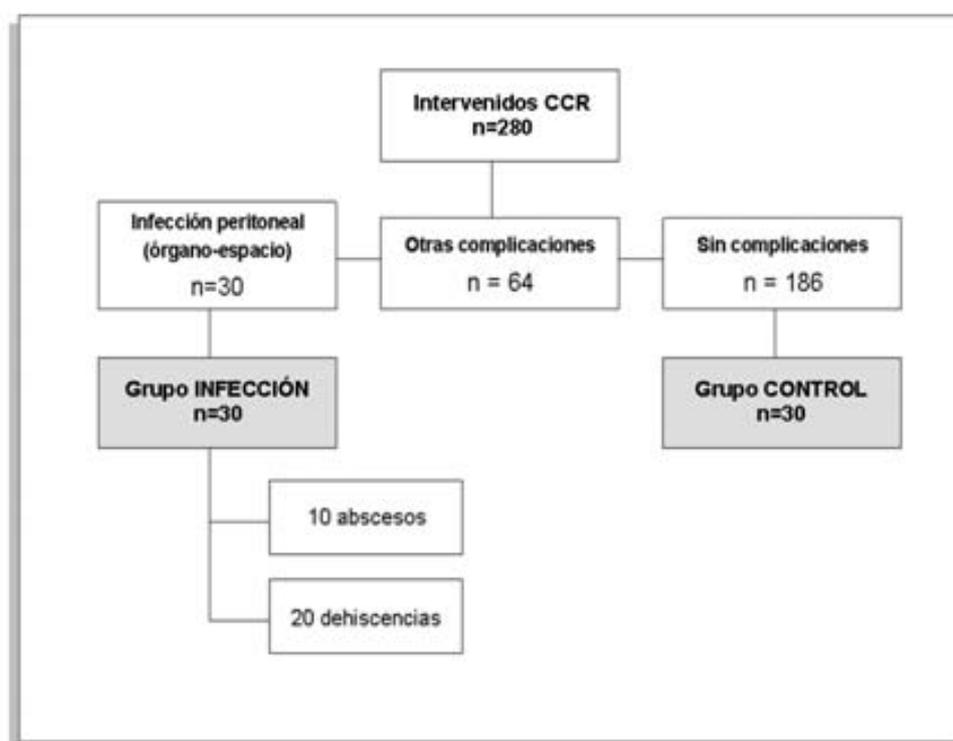


Figura 7. Diagrama de flujo de la inclusión de pacientes en el presente estudio.

La tabla 3 muestra las características de los pacientes en cada uno de los grupos de estudio. Podemos observar, por el diseño del propio estudio, que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la edad media, sexo y localización del cáncer colorrectal.

Tabla 3 Características de los pacientes.

	GRUPO CONTROL <i>n = 30</i>	GRUPO INFECCIÓN <i>n = 30</i>	p
EDAD (años)	74,3 ± 9	75,5 ± 10	<i>p=0,60</i>
SEXO (n) (hombre/mujer)	24/6	24/6	
LOCALIZACIÓN (n)			
ascendente	11	11	
descendente-sigma	13	13	
recto	6	6	
CEA (ng/ml)	4 ± 3	6 ± 7	<i>p=0,50</i>

En los 12 pacientes intervenidos de cáncer de recto no hubo diferencias en la administración del tratamiento neoadyuvante, con quimioterapia y radioterapia, entre ambos grupos (grupo control: 3 pacientes vs. grupo infección: 4 pacientes, $p=0,7$).

Teniendo en cuenta que los pacientes fueron apareados por la localización del tumor, no observamos diferencias en los procedimientos quirúrgicos realizados en los dos grupos: hemicolectomía derecha en los pacientes con neoplasia en colon ascendente,

hemicolectomía izquierda o sigmoidectomía en los pacientes con neoplasia en colon descendente o sigma y resección anterior en los pacientes con neoplasia de recto. En 2 pacientes de cada grupo con neoplasia de recto se realizó una ileostomía derivativa.

La resección del tumor se realizó por laparoscopia en 4 pacientes en cada grupo. No encontramos diferencias ni en el tiempo operatorio ni en la necesidad de transfusión perioperatoria (tabla 4).

Tal y como muestra la tabla 4, 18 pacientes del grupo de infección precisaron una reintervención quirúrgica, en todos los casos por dehiscencia de anastomosis con peritonitis. Los otros 12 pacientes del grupo de infección fueron tratados con un drenaje percutáneo. Los pacientes del grupo de infección presentaron además otras complicaciones como un íleo paralítico en 4 pacientes, neumonía intrahospitalaria en dos pacientes, una infección de herida quirúrgica en 3 pacientes, un caso de hemorragia intraperitoneal y en un paciente una colecistitis aguda postoperatoria. Como era de esperar, la estancia postoperatoria en los pacientes que presentaron una infección peritoneal fue significativamente más prolongada que los que no presentaron complicación alguna. Dos pacientes del grupo de infección fallecieron en los 30 días siguientes a la intervención por complicaciones postoperatorias.

Tabla 4. Variables perioperatorias relacionadas con la intervención.

	GRUPO CONTROL n=30	GRUPO INFECCIÓN n=30	p
Laparoscopia (n)	4	4	<i>p=1,00</i>
Tiempo operatorio (min)	182 ± 68,5	197 ± 68,8	<i>p= 0,60</i>
Transfusión (n)	3	4	<i>p= 1,00</i>
Reintervención (n)	0	18	<i>p<0,001</i>
Estancia (días)	7 ± 4	31 ± 19	<i>p<0,001</i>

La tabla 5 muestra la distribución de los pacientes según el estadio tumoral, una de las variables de apareamiento. No encontramos diferencias significativas en otras características patológicas como el grado de diferenciación o la presencia de invasión linfovascular.

Tabla 5. Características anatomopatológicas de los tumores en ambos grupos.

	GRUPO CONTROL <i>n=30</i>	GRUPO INFECCIÓN <i>n=30</i>	p
Diámetro tumoral máximo (mm)	48 ± 21	51 ± 29	<i>p=0,8</i>
Estadio (n)			
I	5	5	<i>p=1,00</i>
II	17	17	
III	8	8	
Grado (n)			
<i>bajo grado</i>	26	25	<i>p= 0,36</i>
<i>alto grado</i>	4	5	
Infiltración (n)			
<i>vascular</i>	7	8	<i>p=0,76</i>
<i>linfática</i>	6	2	<i>p=0,12</i>
<i>neural</i>	5	9	<i>p=0,22</i>

Desde un punto de vista oncológico no hubo diferencias en la calidad de la cirugía realizada entre los dos grupos, tal y como podemos observar en la tabla 6. El número de ganglios aislados fue similar así como la distancia al margen circunferencial en el caso del cáncer de recto. La cirugía fue R0 en todos los pacientes de los dos grupos.

Tabla 6. Resultados de la cirugía oncológica de colon y recto.

	GRUPO CONTROL <i>n=30</i>	GRUPO INFECCIÓN <i>n=30</i>	p
COLON (n)			
Ganglios aislados	20 ± 9	22 ± 11	<i>p=0,14</i>
RECTO			
Perforación (n)	0	0	<i>p= 1,00</i>
MC (mm)	17 ± 8	16 ± 11	<i>p= 0,28</i>
Mesorrecto:			
<i>Satisfactorio (n)</i>	5	5	<i>p= 1,00</i>
<i>Parcial(n)</i>	1	1	
<i>Insatisfactorio(n)</i>	0	0	

MC: Margen circunferencial.

No hubo diferencias en la administración del tratamiento adyuvante con quimioterapia entre los dos grupos del estudio (grupo control: 7 pacientes vs. grupo infección: 7 pacientes, $p=1,00$).

5.2. Respuesta inflamatoria

5.2.1 Respuesta inflamatoria basal

El valor medio preoperatorio en suero de IL-6, en los 60 pacientes analizados fue de 11 ± 20 pg/ml sin que se observaran diferencias entre los dos grupos (grupo control: 7 ± 15 vs. grupo infección: 16 ± 24 pg/ml, $p=0,1$). No hubo diferencias entre hombres y mujeres ($p=0,4$) ni correlación con la edad ($r=0,009$; $p=0,9$) ni con el valor de CEA preoperatorio ($r=0,1$ $p=0,4$). Tampoco se hallaron diferencias entre los diferentes estadios tumorales ($p=0,6$). Sin embargo, los valores basales de IL-6 se correlacionaron de forma significativa con el tamaño tumoral ($r=0,8$; $p=0,001$).

El valor medio preoperatorio de IL-6 en el líquido peritoneal en los 60 pacientes del estudio fue 15 ± 24 pg/ml, ligeramente mayor que en suero sin que hubiera diferencias significativas entre los dos grupos de estudio (grupo control: 15 ± 20 vs. grupo infección: 16 ± 24 pg/ml; $p=0,7$).

5.2.2 Respuesta inflamatoria sistémica

La concentración de IL-6 en suero aumentó en los dos grupos del estudio tras la intervención quirúrgica. Los niveles de esta citoquina proinflamatoria fueron mayores en aquellos pacientes que presentaron una infección peritoneal tanto a las 48 horas (grupo control: 23 ± 26 vs. grupo infección: 179 ± 245 pg/ml, $p=0,1$) como en el día 4 del postoperatorio (grupo control: 29 ± 93 vs. grupo infección: 1608 ± 3336 pg/ml, $p=0,008$), momento en el que la diferencia alcanzó la significación estadística (Figura 8).

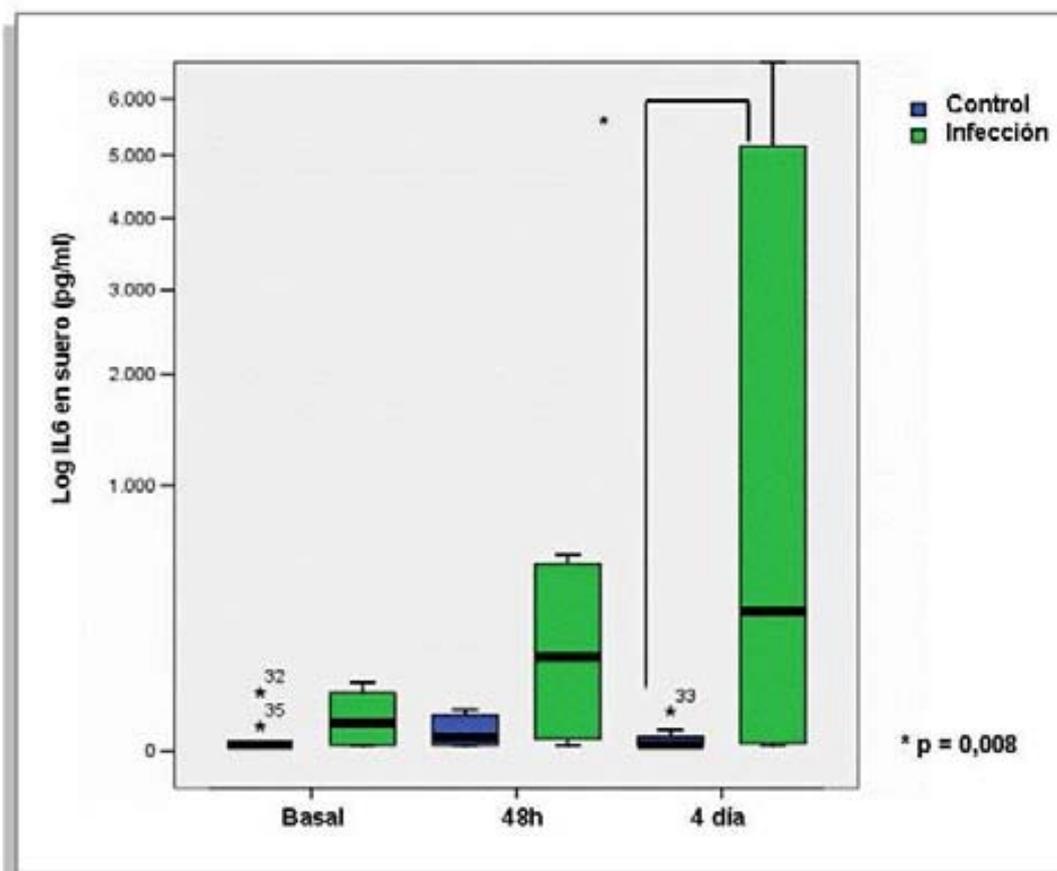


Figura 8. Concentración de IL-6 en suero en los dos grupos.

Al analizar con detalle a los pacientes del grupo de infección, no hallamos diferencias en la respuesta inflamatoria sistémica entre aquellos que presentaron como complicación una dehiscencia de anastomosis con peritonitis en comparación con los que presentaron un absceso intraabdominal. La concentración de IL-6 en suero en el postoperatorio a las 48h fue, respectivamente, de 160 ± 292 vs. 188 ± 232 pg/ml, $p=0,7$ y al cuarto día del postoperatorio fue de 1632 ± 3719 vs. 1589 ± 3238 pg/ml, $p=0,9$.

Cuando comparamos aquellos pacientes que necesitaron una nueva intervención quirúrgica con aquellos tratados con antibioticoterapia y drenaje percutáneo, observamos que la concentración de IL-6 en suero fue más elevada en aquellos pacientes que fueron reintervenidos, tanto a las 48h (226 ± 295 vs 132 ± 189 pg/ml, $p=0,6$) y al cuarto día del postoperatorio (2375 ± 4058 vs 329 ± 774 pg/ml, $p=0,2$) sin llegar a alcanzar la significación estadística.

5.2.3. Respuesta inflamatoria local.

Al igual que ocurrió con los niveles de IL-6 en suero, los valores de esta interleuquina en el líquido peritoneal mostraron un rápido ascenso después de la cirugía en ambos grupos. Hay que destacar que la concentración de IL-6 en el líquido peritoneal fue unas 500 veces superior a la concentración en suero en los dos grupos del estudio.

Además, hemos observado que la concentración de IL-6 en el líquido peritoneal fue significativamente más elevada en el grupo con infección peritoneal a las 48 horas (grupo control: 350 ± 403 vs. grupo infección: 1318 ± 561 pg/ml; $p=0,001$) y al cuarto día del postoperatorio o en el día de la infección (grupo control: 228 ± 415 vs. grupo infección: 1152 ± 470 pg/ml; $p=0,001$) (Figura 9).

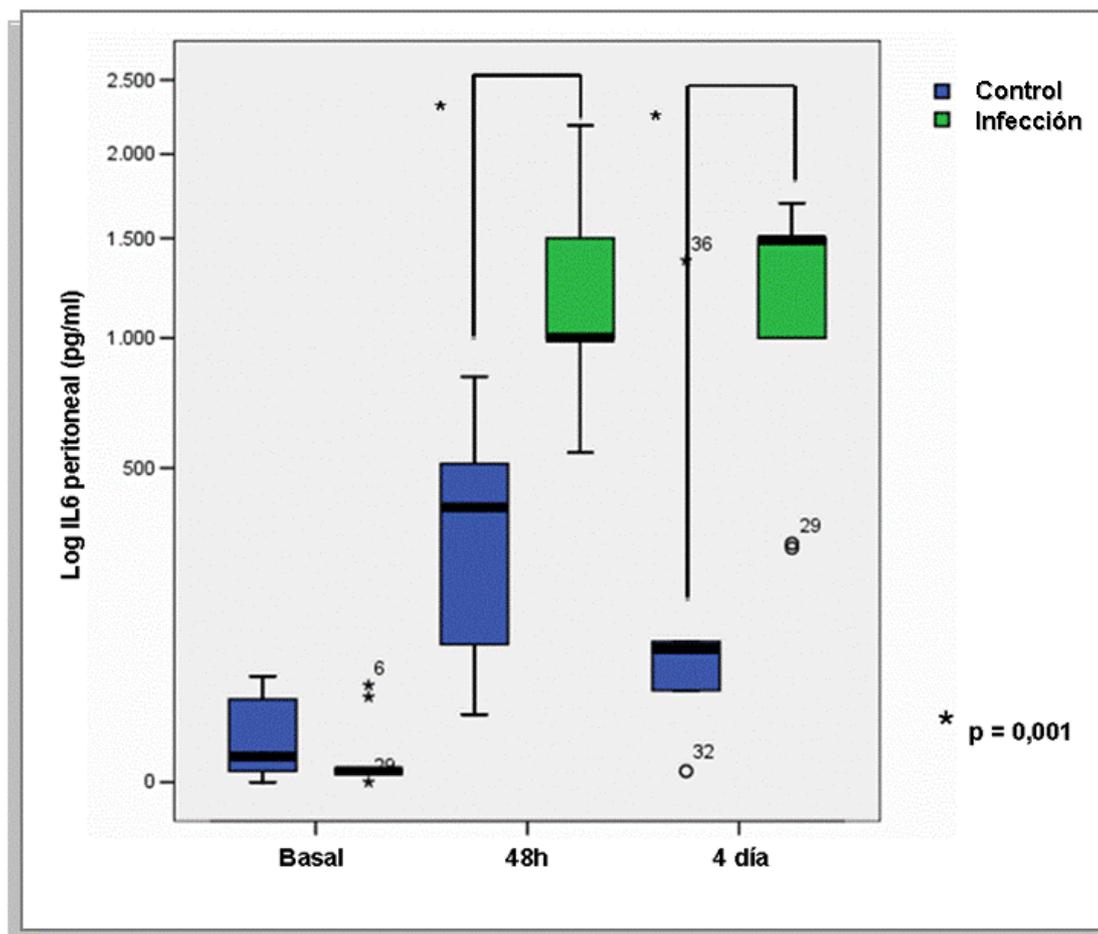


Figura 9. Concentración de IL-6 en el líquido peritoneal en los dos grupos

Al analizar a los pacientes del grupo de infección, sí hallamos diferencias en la respuesta inflamatoria local entre aquellos que presentaron como complicación una dehiscencia de anastomosis en comparación con los que presentaron un absceso intraabdominal. La concentración de IL-6 en líquido peritoneal en el postoperatorio fue mayor a las 48h (1671 ± 634 vs. 1036 ± 287 pg/ml, $p = 0,01$), sin embargo no se encontraron estas diferencias al cuarto día del postoperatorio (1259 ± 450 vs. 1068 ± 493 pg/ml, $p = 0,8$).

Al comparar dentro del grupo de infección a aquellos pacientes que necesitaron una nueva intervención quirúrgica en comparación con aquellos tratados con

antibioticoterapia y drenaje percutáneo no hallamos diferencias ni a las 48h (1410 ± 590 vs. 1174 ± 521 pg/ml, $p=0,3$) ni al cuarto día del postoperatorio (1168 ± 488 vs. 1128 ± 478 pg/ml, $p=0,8$).

5.3. Respuesta angiogénica.

5.3.1. Determinaciones basales de las citoquinas proangiogénicas.

El valor medio preoperatorio en suero de VEGF en los 60 pacientes del estudio fue de 272 ± 231 pg/dl sin que hubiera diferencias entre los dos grupos del estudio (grupo control: 226 ± 194 vs. grupo de infección: 327 ± 236 pg/ml; $p=0,1$). No se observaron diferencias entre hombres y mujeres ni correlación con la edad ($r=0,2$ $p=0,1$). Tampoco se demostró correlación con los niveles preoperatorios de CEA ($r=0,1$ $p=0,3$). No se hallaron tampoco diferencias entre los diferentes estadios tumorales ni correlación con el tamaño tumoral. Los niveles preoperatorios de VEGF en suero no se correlacionaron tampoco con los niveles de IL-6 ($r=0,06$ $p=0,7$).

La determinación basal de la citoquina pro-angiogénica en el líquido del lavado peritoneal al inicio de la intervención mostró unos valores significativamente más bajos que los obtenidos en suero (suero: 272 ± 231 vs. líquido peritoneal: 36 ± 54 pg/ml; $p<0,001$) sin que hubiera diferencias entre los dos grupos del estudio (grupo control: 29 ± 37 vs. grupo infección: 46 ± 69 pg/ml; $p=0,9$).

5.3.2 Respuesta angiogénica sistémica

La figura 10 muestra los cambios en la concentración en suero de VEGF en los puntos analizados en los dos grupos del estudio durante el postoperatorio. Podemos observar como este factor de crecimiento endotelial presentó un aumento progresivo en los dos grupos. Sin embargo, el incremento fue mayor en el grupo de infección peritoneal tanto a las 48 horas (grupo control: 346 ± 216 vs. grupo infección: 1187 ± 2789 pg/ml; $p=0,4$)

como en el 4º día del postoperatorio (grupo control: 458 ± 312 vs. grupo infección: 3329 ± 4103 pg/ml; $p=0,001$) momento en el que alcanzó la significación estadística.

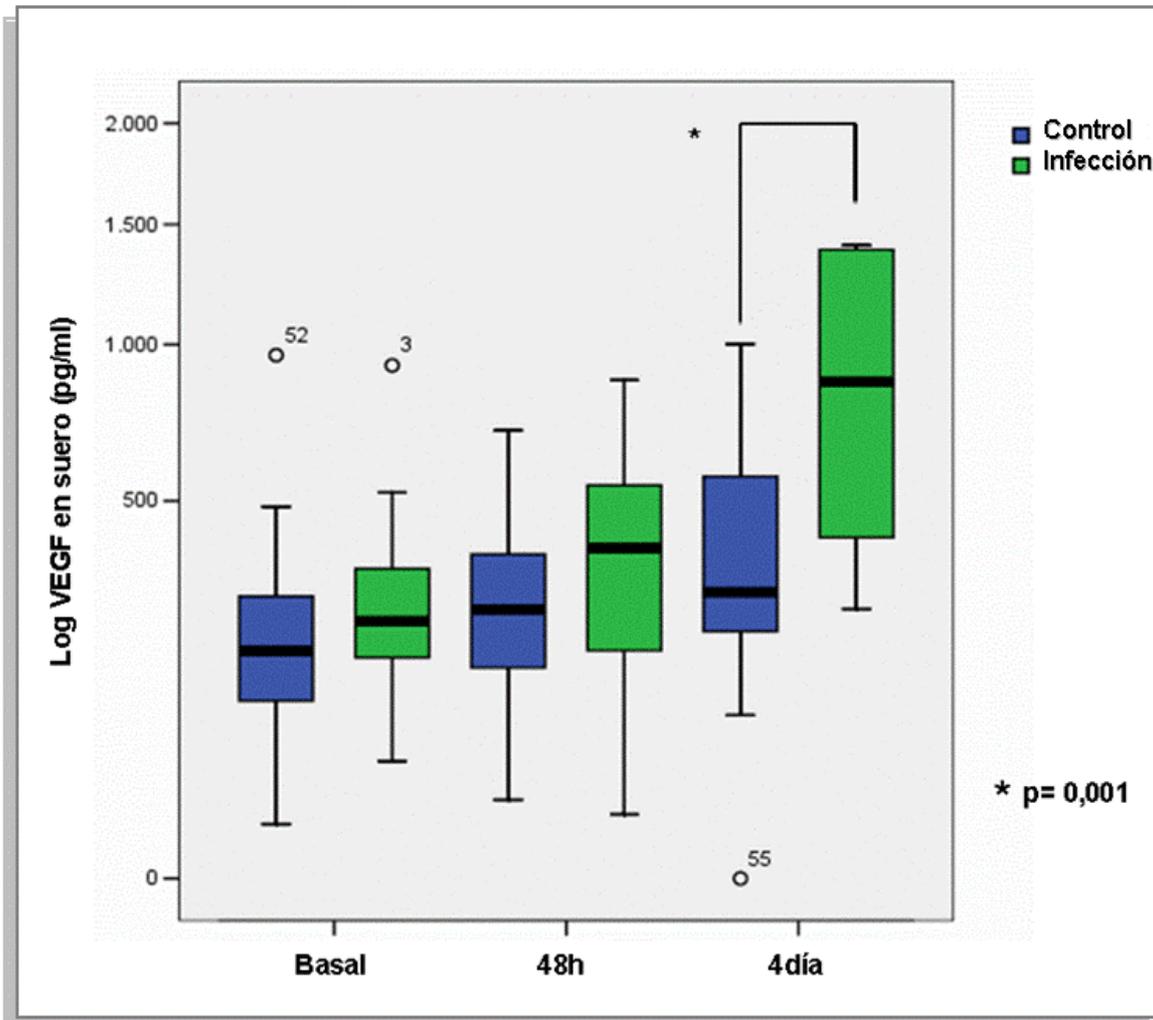


Figura 10. Concentración de VEGF en suero en los dos grupos

Hemos observado además una correlación positiva estadísticamente significativa entre la concentración de IL-6 en suero a las 48 horas y la concentración de VEGF en el 4º día del postoperatorio ($r=0,5$; $p=0,004$).

Cuando analizamos únicamente los pacientes con una infección peritoneal, no encontramos diferencias significativas en la concentración postoperatoria de VEGF entre aquellos que presentaron una dehiscencia con peritonitis en comparación con los

pacientes que presentaron un absceso, ni a las 48h (1264 ± 2909 vs. 1116 ± 2801 pg/ml, $p=0,6$) ni en el 4º día (3417 ± 4336 vs. 3236 ± 4011 pg/ml, $p=0,8$).

Tampoco encontramos diferencias entre aquellos que necesitaron una nueva intervención quirúrgica en comparación con los que fueron tratados con antibioticoterapia y drenaje percutáneo, ni a las 48h (1850 ± 3623 vs. 324 ± 199 pg/ml, $p=0,2$) ni al cuarto día del postoperatorio (3596 ± 4473 vs. 2942 ± 3673 pg/ml, $p=0,8$).

5.3.3 Respuesta angiogénica local.

Los valores basales de VEGF en el líquido peritoneal fueron significativamente más bajos en comparación con los valores de esta citoquina en suero (líquido peritoneal: 29 ± 38 pg/ml vs. suero: 226 ± 194 pg/ml; $p < 0,001$), observándose una correlación significativa entre los niveles basales locales y sistémicos de dicha citoquina ($r = 0.5$; $p < 0,001$). En conjunto, podemos observar un rápido incremento de la concentración local de VEGF en el 2º y 4º día del postoperatorio entre 3 y 5 veces mayor que los valores de VEGF en suero.

La respuesta angiogénica local, valorada por los niveles de VEGF en el líquido peritoneal, fue significativamente más elevada a las 48h del postoperatorio en el grupo de pacientes con infección peritoneal (grupo control: 556 ± 384 vs. grupo infección: 5859 ± 4445 pg/ml; $p=0,001$) y al 4 día del postoperatorio o momento de la infección (grupo control: 674 ± 941 vs. grupo infección: 7048 ± 4092 pg/ml; $p=0,001$) cuando los comparamos con el grupo de pacientes que no presentaron ningún tipo de complicación (Figura 11).

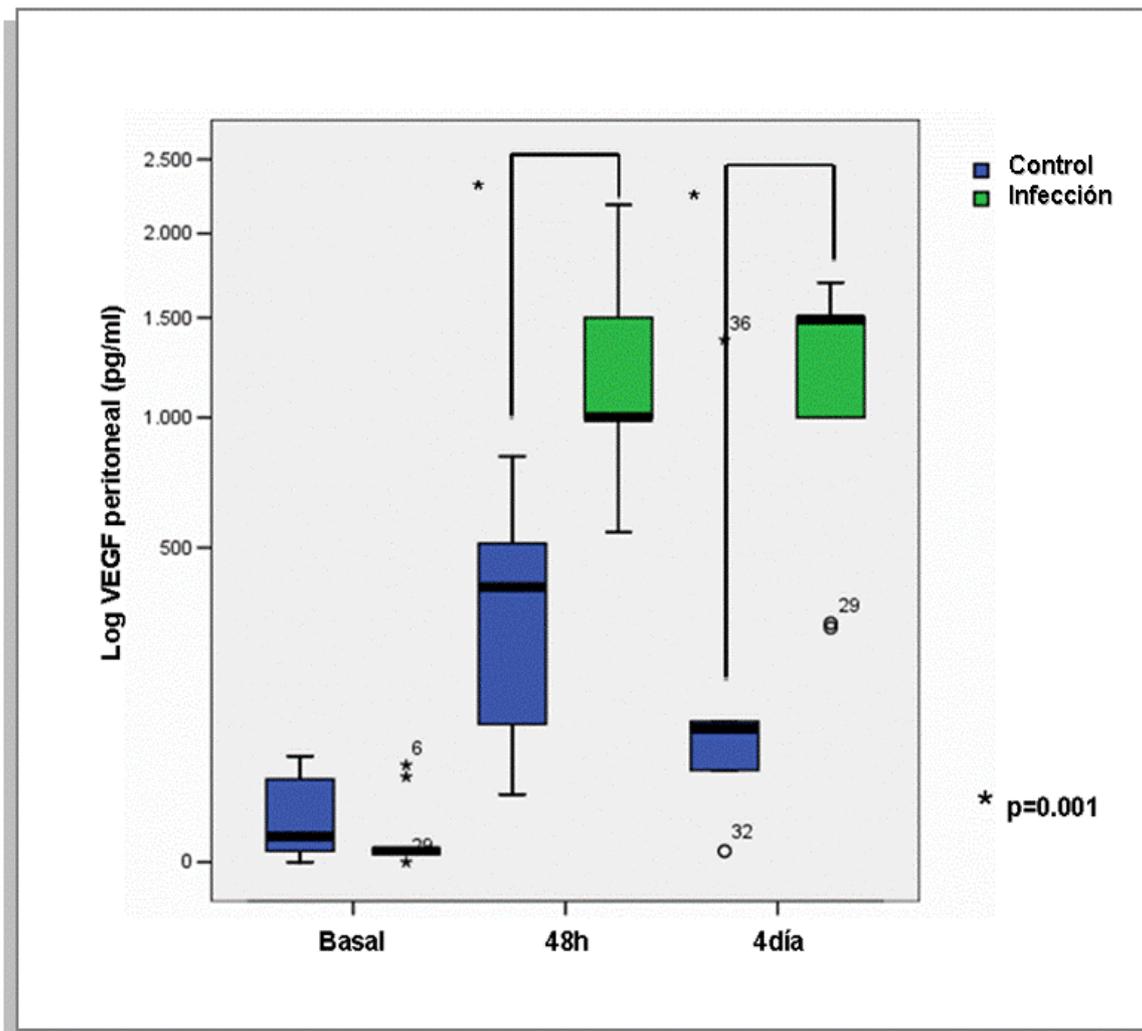


Figura 11: Concentración de VEGF en el líquido peritoneal en los dos grupos.

Al igual que ocurrió en suero, hemos observado una correlación positiva estadísticamente significativa entre la concentración de IL-6 y de VEGF en el líquido peritoneal tanto a las 48 horas ($r=0,6$; $p<0,001$) como en el 4º día del posoperatorio ($r=0,6$; $p=0,004$).

Cuando analizamos únicamente los pacientes con una infección peritoneal, sí hallamos diferencias en la respuesta angiogénica local entre aquellos que presentaron como complicación una dehiscencia de anastomosis en comparación con los que presentaron un absceso intraabdominal. La concentración de VEGF en líquido

peritoneal en el postoperatorio fue mayor al cuarto día del postoperatorio (8570 ± 3498 vs. 5249 ± 4156 pg/ml, $p= 0,08$) en los pacientes que presentaron una dehiscencia.

No encontramos diferencias significativas en la respuesta angiogénica local entre aquellos pacientes con infección peritoneal que precisaron una nueva intervención quirúrgica y los que fueron tratados con un drenaje percutáneo (7482 ± 4328 vs. 6325 ± 3798 pg/ml, $p= 0,5$).

5.4. Recurrencia y supervivencia

5.4.1. Seguimiento

La mediana de seguimiento de los 60 pacientes incluidos en el estudio fue de 37 (24 – 60) meses.

5.4.2. Recurrencia tumoral, mortalidad y supervivencia.

Durante el periodo de seguimiento, 17 (28%) pacientes presentaron una recurrencia tumoral. Trece (43%) pacientes del grupo de infección peritoneal presentaron una recurrencia en comparación con sólo 4 (13%) del grupo de pacientes que no presentaron ningún tipo de complicación ($p= 0,01$) (Tabla 7).

Tabla 7. Recurrencia tumoral global.

RECURRENCIA	GRUPO CONTROL <i>n=30</i>	GRUPO INFECCIÓN <i>n=30</i>	p
SI (n,%)	4 (13%)	13 (43%)	<i>0,01</i>
NO (n,%)	26 (87%)	17 (57%)	

Cuando analizamos el tipo de recurrencia no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la recurrencia local y sí en el porcentaje de recurrencia sistémica (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Recurrencia tumoral local

RECURRENCIA LOCAL	GRUPO CONTROL N=30	GRUPO INFECCIÓN N=30	p
SI (n,%)	1(3%)	2 (7%)	0,5
NO (n/%)	29 (97%)	28 (93%)	

Tabla 9. Recurrencia tumoral sistémica

RECURRENCIA SISTÉMICA	GRUPO CONTROL N=30	GRUPO INFECCIÓN N=30	p
SI (n,%)	4 (13%)	10 (33%)	0,05
NO (n,%)	26 (87%)	20 (67%)	

Cuando analizamos el resultado oncológico por estadios observamos que ningún paciente en estadio I presentó recurrencia del tumor. La recurrencia en el estadio II fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con infección peritoneal (grupo control: 2/17 (12%) vs. grupo infección: 9/17 (53%); $p=0.01$). La recurrencia en el estadio III también fue mayor en los pacientes con infección aunque la diferencia no

alcanzó la significación estadística (grupo control: 2/8 (25%) vs. grupo infección: 4/8 (50%); $p=0.3$).

A continuación comparamos la respuesta inflamatoria y la respuesta angiogénica postoperatoria entre aquellos pacientes que presentaron una recurrencia tumoral y los que no presentaron recurrencia durante el periodo de seguimiento, independientemente del grupo de estudio. Observamos que la concentración de IL-6 en suero (2742 ± 4527 vs. 177 ± 417 , $p=0,005$) y líquido peritoneal al 4º día del postoperatorio (1211 ± 602 vs. 619 ± 599 , $p=0,06$) fue significativamente mayor en aquellos pacientes que presentaron una recidiva durante el seguimiento. Asimismo, encontramos que la concentración de VEGF tanto en suero (3170 ± 4035 vs. 1307 ± 2638 , $p=0,01$) como en el líquido peritoneal (4717 ± 3864 vs. 3278 ± 4438 , $p=0,1$) en el 4º día también fue mayor en los pacientes que presentaron posteriormente una recurrencia, alcanzando la significación estadística en las muestras de suero.

En la tabla 10 podemos observar las variables que resultaron estadísticamente significativas al comparar aquellos pacientes que presentaron una recurrencia tumoral, local y/o a distancia, con aquellos que no la presentaron.

Tabla 10. Análisis bivariado de recurrencia.

VARIABLE	RR (IC 95%)	p-valor
VEGF suero 4º día	1,165 (1,037-1,309)	0,010
VEGF LP 4º día	1,083 (0,966-1,215)	0,171
IL-6 suero 4º día	1,302 (1,084-1,564)	0,005
IL-6 LP 4º día	3,082 (0,934-10,170)	0,065
Sexo (hombre)	1,354 (0,387-4,736)	0,635
Edad	0,981 (0,938-1,026)	0,410
Número ganglios	1,021 (0,974-1,070)	0,386
Ganglios metastásicos	5,668 (1,572-20,435)	0,008
Invasión linfática	0,706 (0,161-3,098)	0,645
Invasión vascular	2,740 (1,040-7,214)	0,041
Invasión neural	2,880 (1,094-7,581)	0,032
CEA	1,011 (0,927-1,102)	0,811
Infección peritoneal	6,047 (1,953-18,721)	0,002
Estadio tumoral	0,966 (0,357-2,616)	0,946

LP: Líquido peritoneal.

Al realizar el análisis multivariado (tabla 11) obtuvimos como factores de riesgo independiente para la recurrencia la infección peritoneal, la invasión neural y la afectación ganglionar.

Tabla 11. Análisis multivariado de recurrencia.

VARIABLE	RR (IC 95%)	p-valor
Ganglios metastásicos	8,443 (2,019-35,309)	0,003
Invasión neural	3,910 (1,344-11,379)	0,012
Infección peritoneal	5,851 (1,851-18,490)	0,003

Al comparar las curvas de supervivencia mediante el test de Log-Rank observamos que la supervivencia libre de enfermedad fue significativamente mayor en los pacientes que presentaron un curso postoperatorio sin complicaciones (grupo control) (figura 12). No observamos, sin embargo, diferencias en la supervivencia global (figura 13).

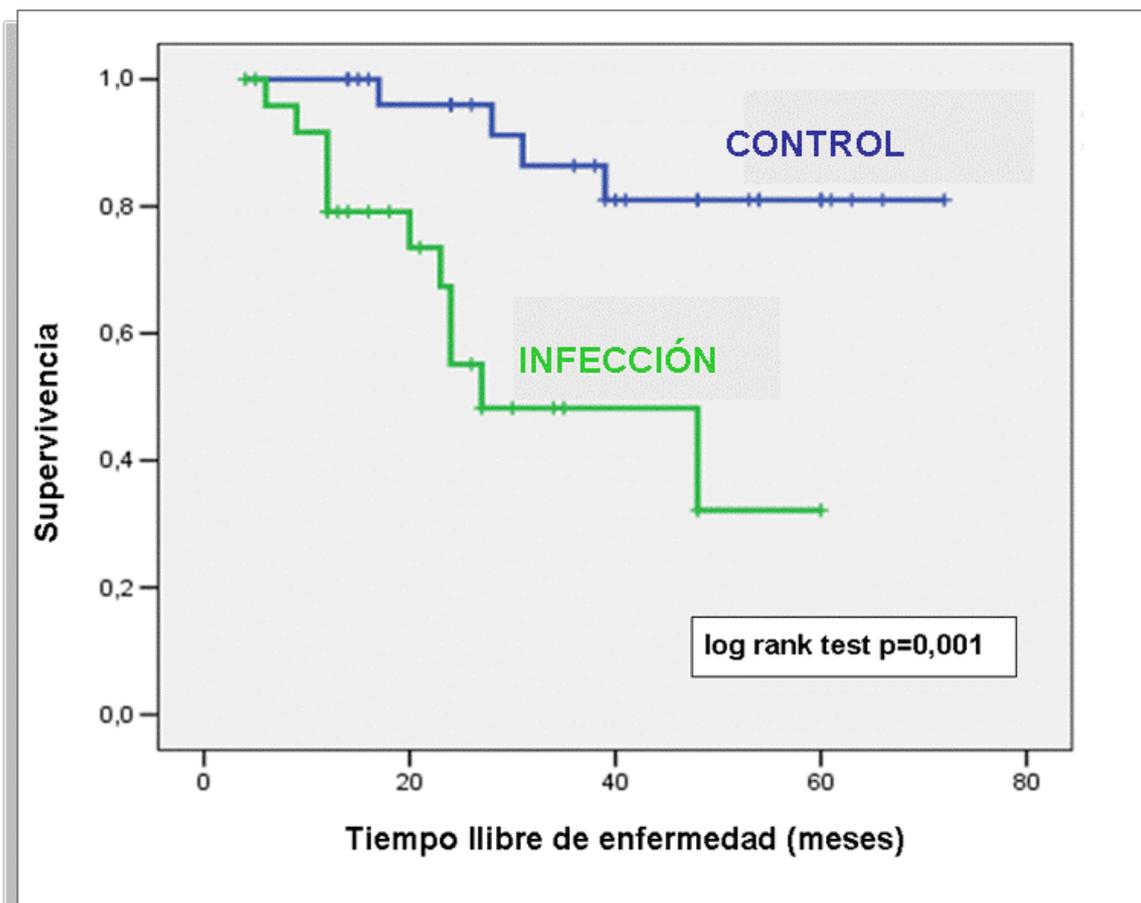


Figura 12. Supervivencia libre de enfermedad en cada uno de los grupos del estudio.

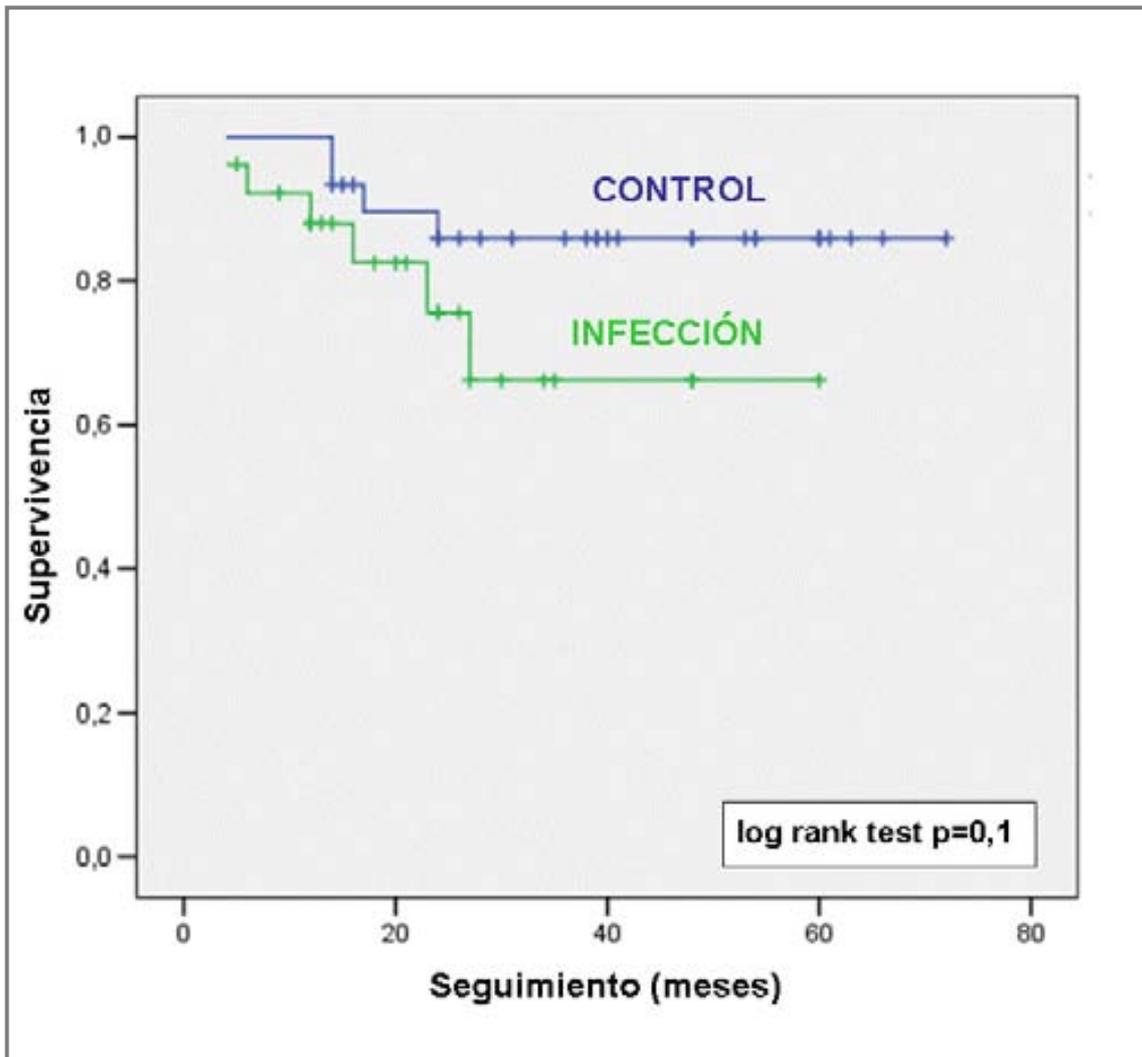


Figura 13. Supervivencia global en cada uno de los grupos del estudio.

5.5 Análisis de microarrays.

Se incluyeron en el análisis de microarrays a 12 pacientes del grupo de infección y 10 pacientes del grupo control. La calidad de los arrays se valoró mediante los diagramas de densidad de la intensidad de señal de cada array (Figura 14) y los diagramas de caja o *box plots* (Figura 15), donde podemos observar una distribución similar en todas las muestras incluidas excepto en una del grupo de infección.

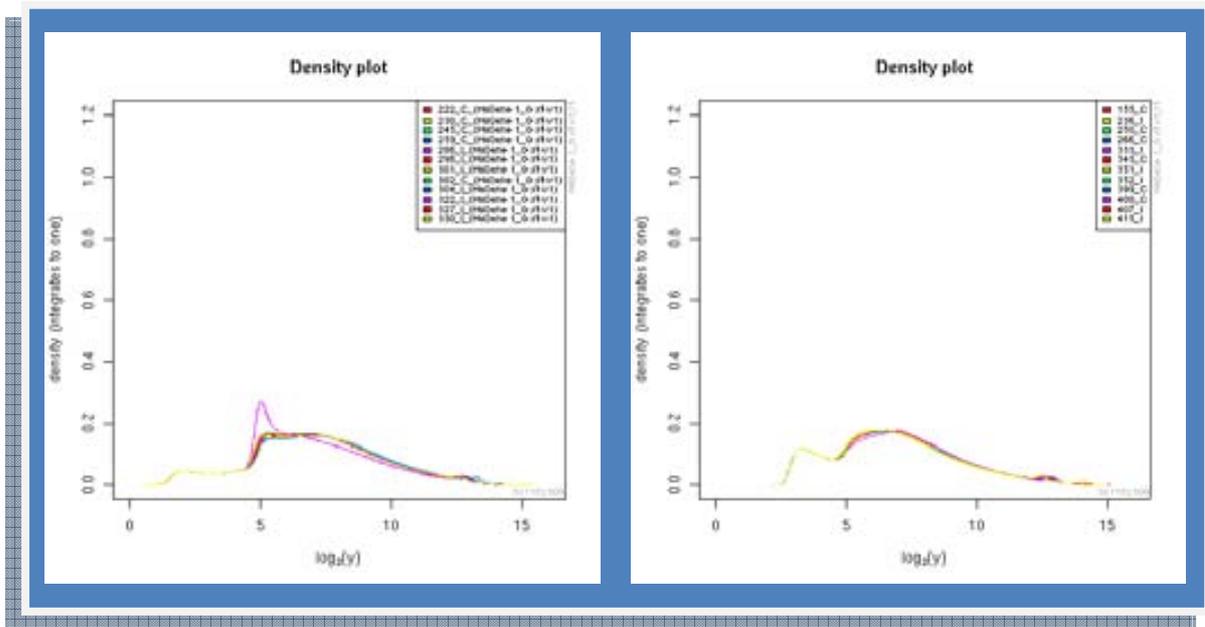


Figura 14. Diagramas de densidad

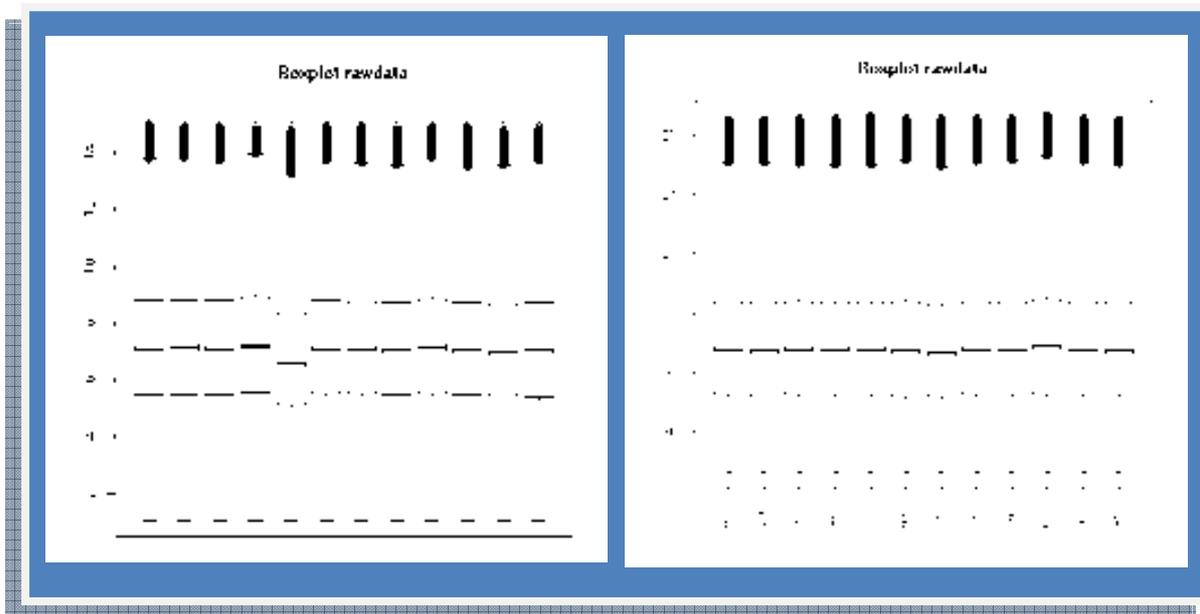


Figura 15. Diagramas de *Box plots*.

Seguidamente se analizó la agrupación de los arrays mediante los diagramas de agrupación jerárquicos (dendrogramas) realizados a partir de la intensidad de todos los genes presentes en el array. En la figura 16 podemos observar la agrupación de las muestras en dos grandes grupos, el de pacientes con infección y los control.

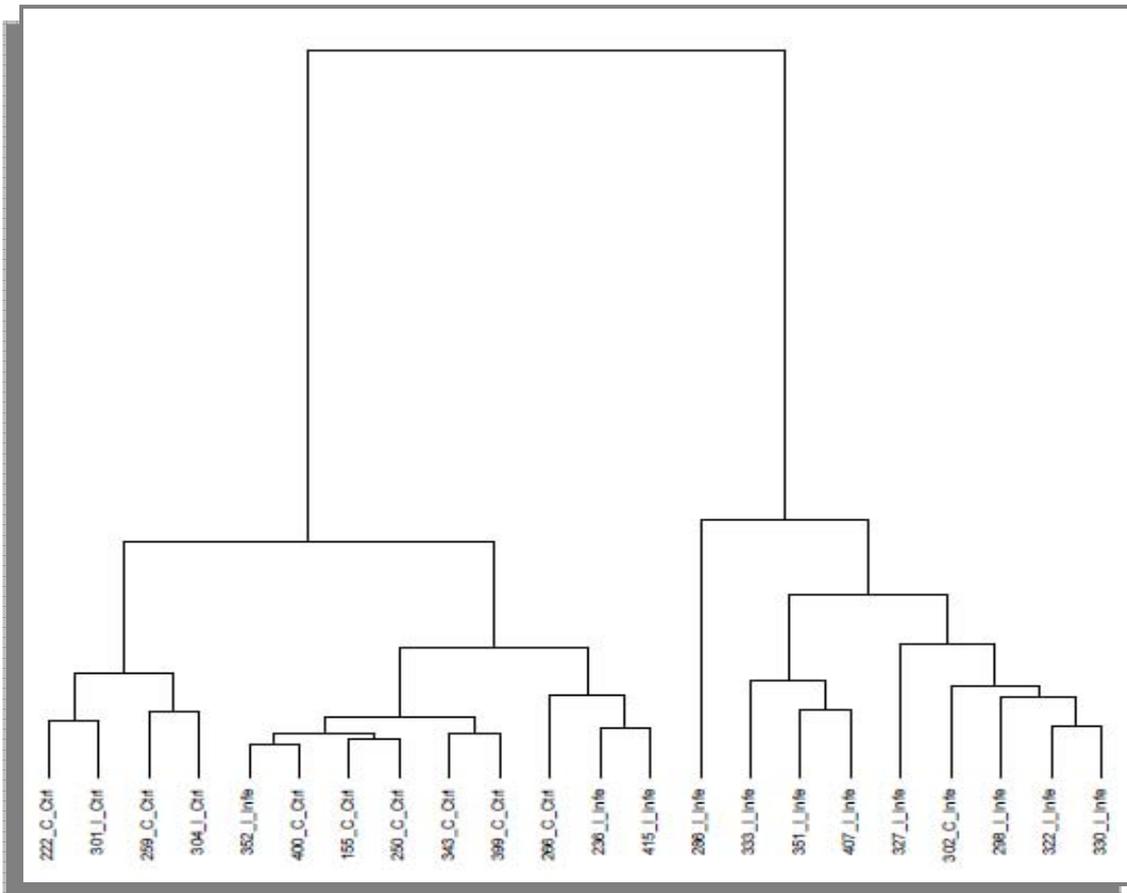


Figura 16. Dendrogramas

Cuando comparamos el grupo de los pacientes que presentaron infección frente a los controles se identificaron 3797 genes con una diferencia de expresión significativa ($p < 0,05$). Al incorporar la medida de log Fold-change (FC), la ratio entre la media de sobreexpresión del grupo control en comparación con la del grupo de los casos, los genes transcritos con $\log FC > +/-1$ fue de 202 y cuando realizamos el análisis con $\log FC > +/-2$ obtuvimos nueve genes transcritos (Figura 17).

AffyID	logFC	AveExpr	P.Value	adj.P.V:	Chrom	Str	Start	Stop	Symbol	mrn:Description	Overexpressed G
8037298	3,74	10,517	3,99E-007	0,002	chr19	-	43879660	43883276	CD177	NA CD177 molecule	Infectado
8029280	3,367	10,97	1,06E-006	0,002	chr19	+	43857825	43867480	CD177	NA CD177 molecule	Infectado
7997188	2,4	8,51	2,85E-006	0,003	chr16	+	72088508	72094957	HP	NA haptoglobin tudor domain containing	Infectado
7977161	2,335	7,1289	3,42E-006	0,003	chr14	+	1,04E+08	1,05E+08	TDRD9	NA 9 N-terminal EF-hand	Infectado
8147244	2,923	7,0053	1,12E-005	0,003	chr8	+	91803778	91971630	NECAB1	NA calcium binding protein 1 G protein-coupled	Infectado
7963770	2,178	8,0577	2,79E-005	0,003	chr12	-	54756229	54758268	GPR84	NA receptor 84	Infectado
8122058	2,088	9,3104	4,28E-005	0,004	chr6	+	1,32E+08	1,32E+08	ARG1	NA arginase, liver	Infectado
7969288	2,768	9,1887	0,000322	0,006	chr13	+	53602830	53626196	OLFM4	NA olfactomedin 4 matrix metallopeptidase	Infectado
7951246	2,503	10,575	0,000599	0,007	chr11	-	1,03E+08	1,03E+08	MMP8	NA 8 (neutrophil	Infectado

Figura 17. Los nueve genes transcritos sobreexpresados en el grupo de infección peritoneal.

EL CD177 es el transcrito más sobreexpresado, $2^{3,74}$ veces más de la media en el grupo de infección en comparación con el grupo control. Seguido por NECAB1 ($2^{2,92}$), OLFM4 ($2^{2,76}$), MMP8 ($2^{2,50}$), HP ($2^{2,4}$), TDRD9 ($2^{2,33}$), GPR84 ($2^{2,17}$) y finalmente el ARG1($2^{2,08}$).

Podemos observar en el siguiente *heat map* los genes diferencialmente expresados entre el grupo de los pacientes con infección peritoneal en comparación con el grupo control combinando los dendrogramas anteriores de las muestras y los genes transcritos (Figura 18 y 19).

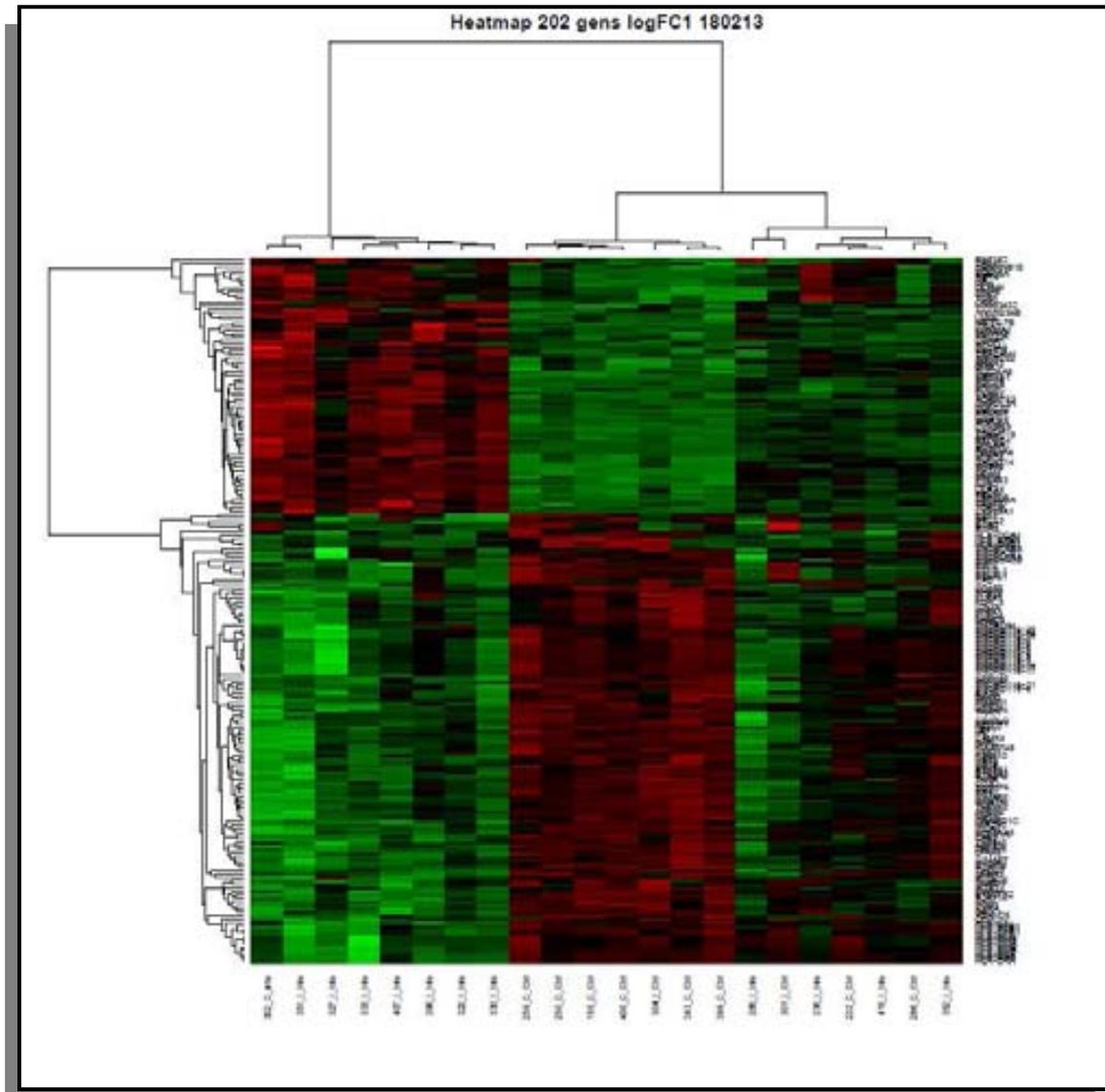


Figura 18. *Heat map*: 202 genes transcrits con logFC+/-1

Verde: genes infraexpresados

Rojo: genes sobreexpresados

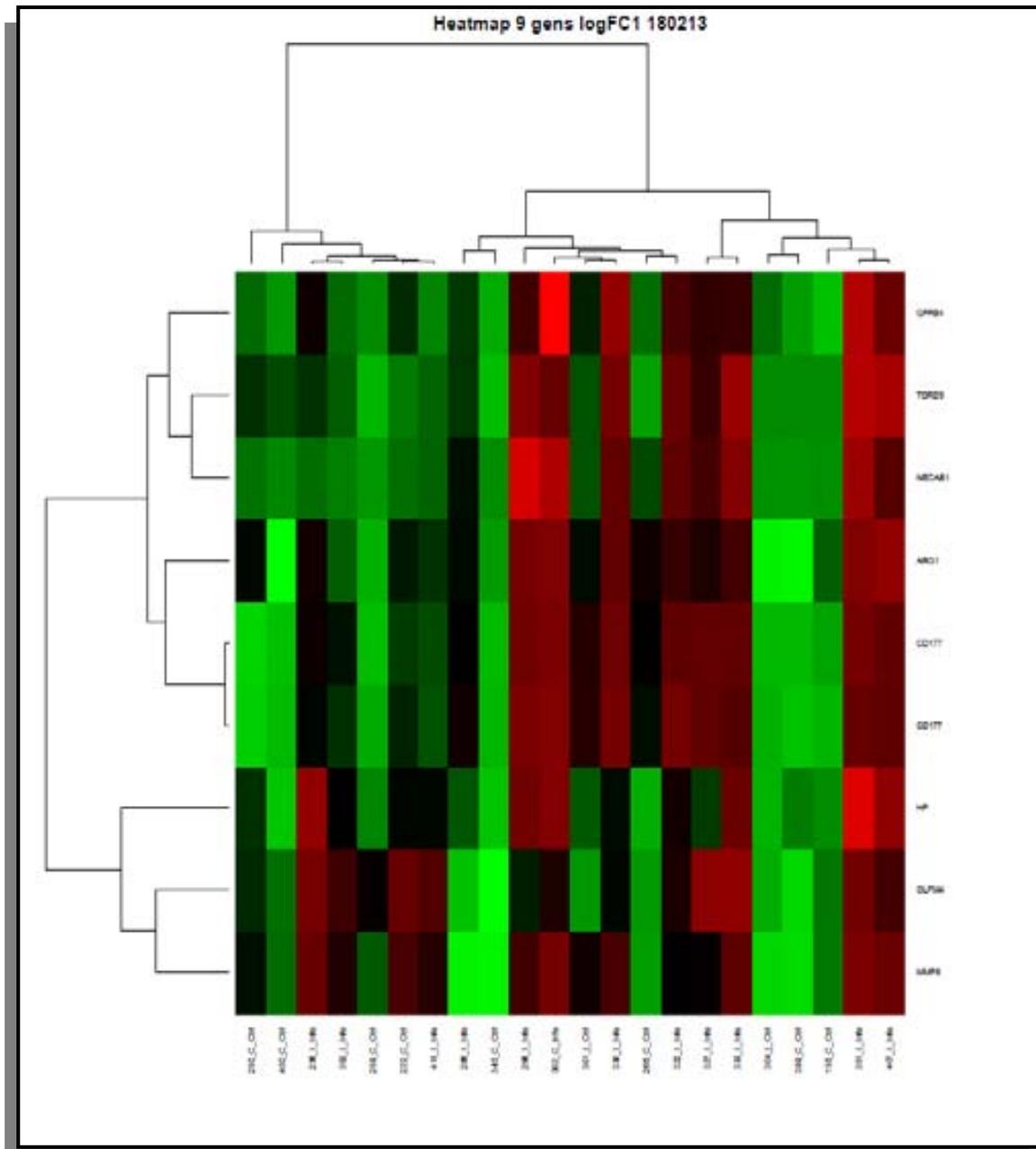


Figura 19. Heat map: 9 genes transcritos con lofFc +/-2

Verde: genes infraexpresados

Rojo: genes sobreexpresados

6. DISCUSIÓN

6.1. Infección peritoneal tras cirugía del cáncer colorrectal: dehiscencia de anastomosis y absceso intraabdominal

La denominada infección del espacio quirúrgico (IEQ) en cirugía de colon y recto es una importante causa de morbilidad que puede alcanzar hasta el 30% según estudios publicados^{176, 177}. La elevada frecuencia de esta complicación, con el consiguiente impacto negativo en la recuperación del paciente, y los elevados costes económicos que comporta ha dado lugar a que muchos países hayan desarrollado sistemas de control de la IEQ como por ejemplo el Sistema de vigilancia de la Infección Nosocomial (NNIS) dependiente del centro para la prevención y control de enfermedades (CDC) de Estados Unidos. Este centro modificó la definición de infección de herida quirúrgica por el concepto de IEQ. Ésta incluye la infección de la herida quirúrgica, superficial o profunda, y la infección órgano-espacio del lecho quirúrgico¹⁷⁸. La dehiscencia de anastomosis y la formación de abscesos son las causas más frecuentes de infección órgano-espacio.

En nuestro entorno, la incidencia acumulada de la IEQ en la cirugía de colon y recto según el VINCAT, programa estandarizado de vigilancia de las infecciones nosocomiales en Cataluña, fue un 20,8 % en el periodo 2007-2010, observándose una amplia variabilidad en las tasas de infección entre los 49 hospitales que participaron en el programa¹⁷⁹.

El sistema de NNIS categoriza todos los procedimientos quirúrgicos de colon y recto en un mismo grupo denominado "COLO" y los índices de IEQ en este grupo están

estratificados de acuerdo con un índice de riesgo establecido. Sin embargo, estudios previos sugieren que las frecuencias de IEQ no son las mismas para el colon y el recto^{180, 181}. En un reciente estudio multicéntrico realizado en Cataluña se evaluó de forma prospectiva la prevalencia de la IEQ en 611 pacientes intervenidos de cáncer de colon y recto de forma consecutiva. El porcentaje global en pacientes intervenidos de cáncer de colon fue del 23,2% (superficial, 12,8%; profunda, 2,1% y órgano-espacio, 8,4%) mientras que en pacientes intervenidos de cáncer de recto fue del 27,6% (superficial, 13,6%; profunda, 5,7% y órgano-espacio, 8,3%)¹⁸². La cirugía del cáncer de recto se asocia con frecuencia a radioterapia preoperatoria, escisión total del mesorrecto con anastomosis próximas al margen anal y a la formación de estomas. Todas estas intervenciones comportan un mayor tiempo quirúrgico y mayor contaminación bacteriana^{181, 183, 184}. Por dicho motivo, la cirugía rectal tiene un mayor riesgo de IEQ. Los factores de riesgo en el desarrollo de las IEQ para el colon y recto han de diferenciarse así como determinar aquellos factores predictivos para cada cirugía¹⁸¹. Es por esa razón que encontramos porcentajes tan amplios en la literatura en infecciones de órgano-espacio en la cirugía colorrectal que oscilan entre 0,5 al 30%^{153, 154, 185, 186}. Si nos centramos en el porcentaje de dehiscencias clínicas de anastomosis en cirugía de colon realizada por cirujanos colorrectales con experiencia la cifra se reduce a un el 3-6%¹⁵⁴; en cambio en la cirugía del recto el porcentaje se eleva al 3-15%¹⁴⁹.

Esta variabilidad descrita en la literatura se debe, al menos en parte, a la falta de una definición objetiva y fácilmente aplicable de dehiscencia de anastomosis en cirugía colorrectal. Podemos encontrar más de 1900 definiciones en la literatura, en la mayoría de las cuales se destaca la importancia de la sospecha clínica y su confirmación por pruebas de imagen o bien durante una intervención quirúrgica¹⁸⁷. En muchos de estos estudios no se clasifica la gravedad de la dehiscencia de

anastomosis. Una revisión sistemática de Bruce et al.¹⁵¹ diferenciaba entre dehiscencias *mayores*, aquellas que comportan un cambio en el tratamiento del paciente; dehiscencias *menores*, aquellas que prolongan la estancia hospitalaria del paciente pero sin cambios en el manejo ni necesidad de reintervención y las dehiscencias *radiológicas*, aquellas diagnosticadas por pruebas de imagen rutinarias. Otros autores definen la dehiscencia como *mayor* cuando ocasiona una sepsis secundaria grave con necesidad de una reintervención, mientras que la *menor* sería aquella que es asintomática y sólo evidente en las pruebas de imagen, dejando un amplio margen entre ambas definiciones¹⁴⁹. En cambio Rahbari et al.¹⁸⁷ propone una clasificación con tres grados para las dehiscencias de recto: grado A, dehiscencia detectada en un estudio rutinario diagnóstico con enema, grado B, necesidad de un tratamiento activo mediante antibióticos, drenajes percutáneos con estabilidad del paciente y grado C, cuando se requiere reintervención quirúrgica. Esta falta de uniformidad tanto en la definición como en el tratamiento de la dehiscencia explica la amplia variabilidad en el porcentaje de la misma. En el presente estudio definimos la dehiscencia de sutura cuando existe evidencia mediante pruebas de imagen o bien por una intervención quirúrgica. Se definió el absceso como aquella colección de líquido intraabdominal con fiebre y/o leucocitosis, cultivo positivo y que precisó tratamiento con antibióticos y drenaje percutáneo.

Se han estudiados diferentes factores de riesgo implicados en la dehiscencia de anastomosis, algunos relacionados con el propio paciente y otros con la técnica quirúrgica. Un factor íntimamente relacionado con la dehiscencia son las anastomosis bajas de recto¹⁴⁹. Virginali et al.¹⁸⁸ en un estudio multivariante en el que se recogían diferentes variables perioperatorias y postoperatorias, halló que el único factor predictivo de dehiscencia era que la distancia de la anastomosis fuera menor de 7 cm al margen anal. Sin embargo otros grupos han demostrado otros factores importantes

relacionados con las dehiscencias de las anastomosis colorrectales. Alves et al.¹⁵³ halló como factores pronósticos independientes la leucocitosis preoperatoria, un ambiente séptico intraoperatorio, dificultades técnicas en la realización de la anastomosis, las anastomosis colocolónicas y las transfusiones postoperatorias. Golub et al.¹⁵⁴ demostró que una concentración de albúmina sérica inferior a 30g/dl, el uso de corticoides, las peritonitis, la obstrucción intestinal, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las transfusiones perioperatorias de más de dos concentrados de hemáties se correlacionaban de forma independiente con las dehiscencias. Estos dos trabajos explicarían el motivo por el que las anastomosis realizadas en urgencias tienen un mayor riesgo de dehiscencia. Otros factores descritos como el ser fumador, el alcoholismo, la enfermedad inflamatoria, la irradiación preoperatoria, un tiempo quirúrgico superior a las dos horas, la contaminación intraoperatoria, el tipo de ASA (American Society of Anesthesiologists)¹⁴⁹ también estarían implicados en un incremento del riesgo. Law et al.¹⁸⁹ halló como factor de riesgo importante para la dehiscencia en las resecciones anteriores de recto el sexo masculino confirmado por el grupo de Rullier et al.¹⁵², los cuales hallaron como únicos factores de riesgo para la dehiscencia en resecciones de recto el nivel de la anastomosis y el sexo masculino entre otras muchas variables. Cuando analizaron únicamente el subgrupo de resecciones de recto bajas, a menos de 5 cm, la obesidad se asociaba de forma significativa a mayor riesgo de dehiscencia.

Desde el punto de vista técnico los principios básicos al realizar una anastomosis es que esté bien perfundida y sin tensión. El tipo de sutura, ya sea mecánica o manual, no interfiere en la tasa de dehiscencia^{153, 154, 189}. Sheridan et al.¹⁹⁰ demostraron que la tensión superficial de oxígeno tisular perianastomótica podría predecir la dehiscencia de sutura, por ello la importancia de mantener unos buenos niveles de oxígeno en sangre optimizando los niveles de hemoglobina preoperatorios y manteniendo unas

tensiones arteriales correctas peroperatorias. Tal y como hemos comentado anteriormente la tasa de dehiscencia de sutura en resecciones anteriores de recto son mayores por lo que debemos poner especial atención durante la cirugía en conseguir una perfusión óptima de la sutura. En este sentido, Dworkin and Allen Mersh ¹⁹¹ demostraron un descenso del 50% de la perfusión del colon sigmoide después de la ligadura de la arteria mesentérica inferior. Hall et al. ¹⁹² también habían observado que después de la ligadura de la arteria mesentérica inferior había una reducción de la tensión de oxígeno tisular en colon sigmoide pero no en colon descendente ni transversal. Por lo tanto concluyeron que en las resecciones rectales se tenía que sacrificar el colon sigmoide para garantizar una mejor perfusión de la anastomosis.

El diagnóstico de la dehiscencia se realiza por sospecha clínica y confirmación radiológica. La prueba de elección es el TAC con contraste transanal hidrosoluble ¹⁹³. Permitirá no sólo confirmar la dehiscencia sino también identificar la presencia de líquido libre o abscesos. El tratamiento dependerá de si se trata de dehiscencias mayores, con peritonitis difusa, o bien menores, con peritonitis localizada o absceso perianastomótico. En las dehiscencias mayores es necesario realizar una laparotomía con lavado de la cavidad abdominal con suero fisiológico y en muchos de estos casos realizar un estoma tras desmontar la anastomosis. Si la anastomosis es de colon derecho y la situación local es favorable podemos rehacer la anastomosis. En cambio en anastomosis de colon izquierdo dependerá de cómo encontremos la sutura. Si el defecto es muy importante con los extremos no viables realizaremos una colostomía terminal y el extremo distal lo cerraremos o bien realizaremos una fístula mucosa dependiendo de la longitud del colon distal. Por el contrario, si el defecto es pequeño y la anastomosis está bien perfundida podríamos suturarlo y realizar un estoma derivativo ¹⁴⁹. En un estudio realizado por miembros de nuestro grupo hace algunos años ya demostramos que hasta en un 80% de las dehiscencias de anastomosis

rectales es posible salvar las mismas con la creación de un estoma derivativo¹⁹⁴. Más recientemente, Fracalvieri et al.¹⁹⁵ observaron que en más del 90% de estos pacientes fue posible cerrar el estoma derivativo, mientras que si se desmonta la anastomosis la reconstrucción del tránsito intestinal se realizó en menos del 40% de los casos. En algunos casos de dehiscencias menores es posible incluso evitar la reintervención. Cuando se trata de una dehiscencia contenida con un absceso alrededor se puede tratar de forma conservadora con antibióticos y drenaje percutáneo. Sin embargo, Damrauer et al.¹⁹⁶ observaron que este tratamiento conservador sólo era posible cuando la TC con contraste no demostraba salida del mismo. Sin embargo, en aquellos pacientes en los que la TC mostraba paso de contraste al absceso contiguo la necesidad de tratamiento quirúrgico, la morbilidad y la mortalidad postoperatoria eran similares a las dehiscencias mayores.

6.2. Respuesta inflamatoria y angiogénica a la infección peritoneal

6.2.1. Respuesta inflamatoria basal

La existencia de una respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con cáncer de colon es bien conocida⁴⁶. Se ha sugerido que la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con cáncer de colon es un factor de mal pronóstico^{49, 197} y varios estudios han demostrado que los niveles preoperatorios de IL-6 en suero se correlacionan con el tamaño del tumor, el valor del CEA y con estadio tumoral^{51, 52}. En un estudio con 164 pacientes con cáncer de colon y recto, Chung et al. observaron que niveles preoperatorios de IL-6 en suero superiores a 12 pg/dl se correlacionaban con un mayor tamaño tumoral, con unos niveles más elevados de PCR en suero y con la presencia de metástasis hepáticas⁵². **En el presente estudio, la concentración basal de IL-6 se correlacionó con el tamaño tumoral pero no con el CEA preoperatorio.** Tampoco hemos observado diferencias en la concentración de IL-6 basal entre los diferentes estadios a diferencia de un estudio

previo de nuestro grupo ¹³⁶ en el que los valores basales de IL-6 fueron más elevados en pacientes en estadio II y III en comparación con el estadio I. Como era de esperar, teniendo en cuenta el diseño del estudio, no hemos encontrado diferencias entre los niveles preoperatorios de IL-6 entre los pacientes de ambos grupos.

6.2.2. Respuesta inflamatoria sistémica a la cirugía: influencia de la infección peritoneal

Los resultados del presente estudio confirman, en primer lugar, que todo traumatismo quirúrgico induce una respuesta inflamatoria sistémica precoz que se puede medir mediante la determinación de IL-6 en suero. En ambos grupos del estudio los niveles de IL-6 presentaron una elevación en el postoperatorio inmediato, al igual que en una de las primeras descripciones sobre la utilización de esta citoquina como marcador del daño tisular tras cirugía¹¹². Se ha descrito clásicamente que los valores del IL-6 en suero tras cirugía mayor empiezan a elevarse a las 3 horas del inicio de la operación alcanzando su pico máximo a las 24 horas y normalizándose sus niveles posteriormente¹⁹⁸. Aunque en nuestro estudio la primera determinación se hizo a las 48 horas, los valores eran todavía más elevados que los basales en ambos grupos. Esta respuesta inflamatoria sistémica es proporcional a la intensidad del traumatismo quirúrgico^{127, 133, 199}. Así, la concentración de IL-6 y otras citoquinas pro-inflamatorias es mayor tras cirugía abierta en comparación con cirugía laparoscópica tal y como hemos demostrado previamente¹³⁶.

En segundo lugar, **hemos observado que la respuesta inflamatoria sistémica es mayor cuando ocurre una infección peritoneal. La concentración de IL-6 en suero en el 4º día del postoperatorio o en el momento de la infección fue significativamente mayor en aquellos pacientes que presentaron una dehiscencia de anastomosis o absceso en comparación con los pacientes que**

siguieron un curso postoperatorio sin complicaciones. Debemos atribuir a la infección postoperatoria esta mayor concentración de IL-6 ya que no hubo diferencias entre los dos grupos en otros factores que pueden influir en la respuesta a la agresión como el tipo de abordaje, la duración de la intervención quirúrgica o la transfusión perioperatoria^{112, 129}. Una evidencia adicional que apoya el valor de esta interleuquina como marcador de la respuesta inflamatoria: en el grupo de pacientes con infección, la concentración de IL-6 en suero en el postoperatorio fue mayor en aquellos que fueron reintervenidos en comparación con los que se trataron con un drenaje percutáneo, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.

Mokart et al.²⁰⁰ obtuvieron resultados similares hace algunos años en una serie de 30 pacientes consecutivos intervenidos de cáncer: exenteración pélvica en 13 casos, peritonectomía en 6, esofagectomía en 8 pacientes y gastrectomía en 3. Los 30 pacientes fueron divididos en 3 grupos dependiendo de la evolución postoperatoria: pacientes que no presentaron complicaciones (n=11), pacientes que presentaron sepsis o sepsis grave (n=14) y pacientes que presentaron un shock séptico (n=5). Tras la cirugía, los niveles circulantes de IL-6 se elevaron de forma significativa en los 3 grupos en comparación con los valores basales. Sin embargo, al igual que en el presente estudio, el incremento fue significativamente mayor en los grupos de sepsis y shock séptico en comparación con los pacientes que no presentaron complicaciones. Además, el retorno a los valores normales fue mucho más lento en los pacientes que presentaron una infección. En otro estudio más reciente, Kimura et al.²⁰¹ observaron que los niveles plasmáticos postoperatorios de IL-6 e IL-8 eran significativamente más elevados en pacientes con infección del sitio quirúrgico tras una duodenopancreatectomía que en aquellos sin infección. Además, cuando se consideraron únicamente los pacientes con infección intraabdominal, los niveles de IL-

6 fueron más elevados en aquellos que habían presentado una dehiscencia que en aquellos que presentaron infección sin dehiscencia.

Por otra parte, es interesante destacar que en el presente estudio la concentración de IL-6 en suero 48 horas después de la cirugía ya fue más elevada en los pacientes del grupo de infección peritoneal, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. Ello ocurrió a pesar de que en la mayoría de los casos la infección no había sido todavía diagnosticada. En este sentido, varios trabajos han demostrado que valores elevados en suero de IL-6^{202, 203}, así como también de la PCR²⁰⁴, constituyen un marcador precoz de complicación infecciosa postoperatoria. En un estudio realizado sobre 32 pacientes en los que se realizó cirugía gastrointestinal mayor, se demostró que los niveles postoperatorios de IL-6 en suero superiores a 25 pg/ml se asociaban de forma independiente, junto con una PCR > 30 mg/l, con un mayor riesgo de infección por lo que proponían que podía ser un marcador predictivo útil²⁰⁵. La concentración sérica de IL-6 puede permitir también la detección precoz de infecciones en pacientes con fracturas abiertas antes de que sean clínicamente evidentes²⁰⁶.

6.2.3. Respuesta inflamatoria local a la cirugía: influencia de la infección peritoneal

En primer lugar debemos destacar que la respuesta inflamatoria local, valorada mediante la determinación de IL-6 en el líquido peritoneal, fue significativamente mayor que la respuesta inflamatoria sistémica. En este estudio, la concentración local de IL-6 fue hasta 500 veces superior a la determinada en suero. Además, el descenso durante los primeros días del postoperatorio fue mucho más paulatino en comparación con los niveles en suero. En el ensayo clínico en pacientes con cáncer de colon realizado recientemente por nuestro grupo¹³⁶ en el que comparamos cirugía abierta y

laparoscópica ya observamos esta diferencia tan importante entre la respuesta inflamatoria local y sistémica.

Aunque el perfil de las citoquinas pro-inflamatorias en el exudado de las heridas quirúrgicas ha sido investigado por varios autores^{130, 207, 208}, la información sobre las modificaciones que tienen lugar en la expresión local de dichas citoquinas tras cirugía colorrectal es limitada. Wu et al.¹³⁰ determinaron por primera vez la concentración de varias citoquinas pro-inflamatorias no sólo en suero sino también en líquido peritoneal en un grupo de 26 pacientes intervenidos de cáncer de colon. Los autores observaron, al igual que hemos confirmado ahora, que los niveles de IL-6 en el líquido peritoneal eran más de 100 veces superiores a los determinados en suero y que además permanecían elevados más tiempo. Baker et al.²⁰⁷ realizaron el mismo estudio en un grupo de 44 pacientes intervenidos de cáncer colorrectal. Los niveles de IL-6 en el líquido peritoneal fueron también mucho más elevados que en plasma, alcanzando un valor máximo en el primer día del postoperatorio. Esta observación no es sorprendente si tenemos en cuenta que tras cualquier traumatismo las citoquinas son sintetizadas y liberadas en primer lugar por leucocitos, macrófagos y otros tipos celulares en el foco lesional antes de ser liberadas a la circulación sistémica. En este sentido, se ha sugerido que la respuesta a la agresión quirúrgica es sólo un reflejo menor de lo que ocurre localmente²⁰⁹. La hipótesis de la “compartimentalización” de las citoquinas en respuesta a la agresión ha sido propuesta por Schein et al.²¹⁰. Según estos autores los valores en suero de las citoquinas proinflamatorias sólo representarían un pequeño porcentaje de lo que genera localmente. A esto se añade la interrupción del drenaje linfático y vascular en el lecho quirúrgico, lo que impediría la llegada de todos estos mediadores al torrente vascular sistémico. Mientras la presencia de IL-6 en suero es determinante en la producción de proteínas de fase aguda por el hígado, el aumento local de IL-6 tendría su función en el reclutamiento de células inmunitarias que a su

vez producen otras citoquinas y factores de crecimiento que participan en la propia curación de las heridas¹³⁰.

En segundo lugar, **al igual que ocurrió con la respuesta inflamatoria sistémica, la respuesta inflamatoria local fue mayor en el grupo de pacientes que presentaron una infección peritoneal durante el postoperatorio en comparación con aquellos que no presentaron ningún tipo de complicación.** En este caso, los niveles de IL-6 en el líquido peritoneal fueron significativamente más elevados en los pacientes con infección tanto a las 48 horas, cuando todavía no se había diagnosticado la infección, como en el cuarto día del postoperatorio. Otros autores han observado también una elevación precoz de citoquinas pro-inflamatorias en el líquido peritoneal que podría utilizarse como herramienta para el diagnóstico precoz de la dehiscencia de anastomosis tras cirugía colorrectal^{211,212}. Fouda et al.²¹¹ analizaron de forma prospectiva 56 pacientes a los que se les practicó una resección anterior de recto, 8 de los cuales presentaron una dehiscencia de anastomosis. Los niveles de IL-6 e IL-10 en el líquido peritoneal fueron significativamente más elevados en los pacientes con infección antes incluso del diagnóstico de la dehiscencia. En un reciente estudio experimental en el que se empleó un modelo de peritonitis en ratas, la concentración en el líquido peritoneal de IL-6, IL-10 y TNF-alpha permitió predecir incluso la mortalidad de los animales²³².

6.2.4. Respuesta angiogénica basal

Varios estudios han demostrado que los pacientes con cáncer de colon presentan una concentración basal de VEGF en suero significativamente más elevada que los controles sanos^{213, 214}. La elevación de VEGF y otras citoquinas pro-angiogénicas, en suero y en plasma, también ha sido demostrada en pacientes con cáncer de mama²¹⁵, carcinoma de células renales²¹⁶, cáncer de esófago²¹⁷ y cáncer gástrico²¹⁸ entre otras

neoplasias. Aunque la inclusión de un grupo de controles sanos no formaba parte del diseño del presente estudio, y por ello no podemos realizar comparaciones, los niveles de VEGF obtenidos en suero son similares a los observados en los trabajos anteriormente mencionados con una concentración basal media superior a los 300 pg/dl.

El aumento de la expresión de VEGF en pacientes con cáncer es debido, fundamentalmente, a la producción por las propias células tumorales. Sin embargo, otros tipos celulares como los macrófagos asociados al tumor, localizados en el compartimiento estromal desempeñan también un papel importante en la regulación de la angiogénesis tumoral²¹⁹. Los leucocitos y especialmente las plaquetas también presentan un aumento de la expresión de VEGF en pacientes con cáncer²²⁰. Por otra parte, aunque los niveles de VEGF en suero publicados en individuos sanos son significativamente más bajos, éstos no son indetectables. El origen y el significado biológico del VEGF sérico en individuos sanos no está claro. Sin embargo, el hallazgo de VEGF y del receptor de VEGF en células hematopoyéticas pluripotenciales, megacariocitos y plaquetas sugiere que esta citoquina desempeña un papel en el mantenimiento fisiológico de la integridad endotelial²²¹.

Malamitsi et al.²²² han investigado la diferencia en la concentración de VEGF entre hombres y mujeres y en función de la edad en una cohorte de más de 100 sujetos sanos. Los autores encontraron que los niveles de VEGF en suero están más elevados en mujeres que en hombres y también durante aquellas etapas caracterizadas por un aumento del crecimiento y del desarrollo como la neonatal. El aumento de la angiogénesis fisiológica en mujeres se ha atribuido al fenómeno cíclico del crecimiento folicular así como al crecimiento del endometrio por el remodelado dinámico de su aporte vascular²²³. Sin embargo, en los trabajos realizados en

pacientes con cáncer, incluido el presente estudio, no se han observado diferencias entre hombres y mujeres^{213, 214, 218}. Por otra parte, aunque De Vita et al.²¹⁴ encontraron una correlación negativa entre la edad y la concentración de VEGF en una cohorte de 81 pacientes con cáncer de colon, la mayoría de los estudios no han demostrado diferencias entre adultos jóvenes y ancianos^{213, 218}.

A diferencia de otros autores^{213, 214, 216, 218}, no hemos encontrado correlación entre la concentración basal de VEGF y el tamaño tumoral o el CEA ni diferencia entre los estadios. Karayiannakis et al.²¹³ observaron una asociación significativa entre la concentración basal de VEGF y el estadio tumoral, el grado de invasión en la pared del colon y la presencia de metástasis linfáticas y a distancia. En el estudio de De Vita²¹⁴ los niveles preoperatorios de VEGF fueron significativamente más elevados en aquellos pacientes en los que no se pudo realizar una resección curativa. Creemos que la ausencia de dichas correlaciones en el presente estudio se debe, al menos en parte, a que no hemos incluido pacientes en estadio IV ni resecciones que no fueran R0.

Por otra parte, tampoco hemos encontrado una correlación entre los niveles basales de VEGF y la concentración sérica preoperatoria de IL-6, algo que sí habíamos observado en un estudio previo¹³⁶. La correlación positiva entre la citoquina proinflamatoria y el factor angiogénico ha sido descrita por otros autores y apoya la interacción de IL-6, marcador de la respuesta inflamatoria tumoral, con la angiogénesis^{224, 225}. Esta correlación se fundamenta en la capacidad ya conocida de la IL-6 de inducir la expresión de VEGF en diferentes líneas de células tumorales²²⁶.

La determinación basal de citoquinas proangiogénicas en el líquido peritoneal presenta alguna limitación metodológica. La obtención de líquido peritoneal antes de la intervención hubiera precisado la realización de una punción-lavado peritoneal no

justificada desde un punto de vista ético. Por ello decidimos obtener las muestras inmediatamente después de realizar la laparotomía o el neumoperitoneo dependiendo de la vía de abordaje. El hecho de que las concentraciones de VEGF en el líquido peritoneal basal sean significativamente más bajas que en suero sugiere, en primer lugar, que la producción de estas citoquinas por células mesenquimales es mínima en comparación con las células neoplásicas y que, en segundo lugar, la obtención de las muestras unos minutos después del inicio de la intervención no afecta al resultado.

Se han descrito diferentes técnicas para determinar el VEGF circulante lo que explica una gran variabilidad entre los diferentes estudios, de hasta tres órdenes de magnitud, dependiendo de la prueba utilizada. Algunos investigadores han utilizado técnicas de inmunoensayo competitivas que detectan la cantidad total de VEGF circulante, mientras otros han utilizado técnicas de inmunoensayo de captura con anticuerpos neutralizantes que detectan sólo el VEGF libre ²²⁷. Además, en algunos ensayos se utilizan anticuerpos que son específicos para algunas isoformas de VEGF. El método empleado en el presente estudio es una técnica de inmunoensayo cuantitativa de captura ampliamente utilizada y que ha sido diseñada para medir los niveles de VEGF₁₆₅ libre, la isoforma predominante. De acuerdo con el fabricante, los resultados obtenidos en la determinación del VEGF humano producido de forma natural y en la determinación del VEGF₁₂₁ recombinante son superponibles con las curvas de estándar que se consiguen con ese *kit*, por lo que se considera que puede ser utilizado para determinar los valores relativos de VEGF humano.

Finalmente, otro aspecto metodológico de nuestro estudio que debe ser comentado, relacionado con el análisis de los niveles de VEGF, es la elección de suero de los pacientes para realizar dichas determinaciones. Algunos consideran que la determinación de VEGF es más apropiada en plasma^{227, 228} que en suero⁹⁴. La

centrifugación de la sangre coagulada da lugar al suero, mientras que la centrifugación de una muestra de sangre a la que se ha añadido un anticoagulante proporciona plasma. El VEGF almacenado en los leucocitos y en las plaquetas es liberado durante el proceso de formación de los coágulos, lo que explica porqué los niveles séricos de VEGF son considerablemente más elevados que los del plasma²²⁹. Sin embargo, se ha demostrado que las plaquetas aisladas de pacientes con cáncer contienen más VEGF que las plaquetas aisladas de controles sanos⁷⁰. También se ha demostrado que la concentración de VEGF en suero en pacientes con cáncer y un recuento plaquetario normal es mayor que en controles sanos y un recuento plaquetario normal²³⁰. Finalmente, en un estudio reciente se ha demostrado mediante análisis multivariado que una concentración preoperatoria elevada de VEGF en suero es un factor predictivo independiente de una menor supervivencia, mientras que una concentración elevada en plasma no lo es²³¹. Por todas estas razones creemos que está justificada la elección de suero como muestra para la determinación del VEGF en el presente estudio.

6.2.5. Respuesta angiogénica sistémica a la cirugía: influencia de la infección peritoneal

Los resultados de nuestro estudio demuestran que durante el postoperatorio inmediato se produce un aumento de los niveles de VEGF en suero en pacientes intervenidos de cáncer de colon, tal y como ya habíamos observado previamente¹³⁶.

El presente estudio proporciona además nueva información sobre la respuesta angiogénica sistémica a la cirugía. La angiogénesis postoperatoria no sólo está incrementada en aquellas intervenciones en las que la agresión quirúrgica es mayor sino que además está amplificada en presencia de una infección peritoneal. La concentración de VEGF en suero durante el

postoperatorio fue mayor en los pacientes con infección, alcanzando la significación estadística en el cuarto día del postoperatorio. Aunque trabajos anteriores habían descrito la influencia de la infección peritoneal sobre la respuesta inflamatoria^{200, 201}, éste es el primer estudio clínico en el que se demuestra su influencia sobre la angiogénesis. Estos resultados coinciden con los observados previamente por nuestro grupo en un modelo experimental de cáncer de colon e infección peritoneal¹⁷⁰.

Al igual que ocurrió con la determinación de IL-6, es interesante destacar que la concentración de VEGF en suero a las 48 horas ya fue más elevada en los pacientes con infección, aunque no alcanzó la significación estadística. Ello ocurrió a pesar de que en la mayoría de los casos la complicación intraabdominal no había sido todavía diagnosticada. De esta forma, la concentración sérica de VEGF podría ser un marcador que permitiera la detección precoz de esta complicación al igual que se ha sugerido con la PCR o la IL-6²³².

La demostración de unos niveles postoperatorios de VEGF en suero más elevados en aquellas intervenciones en las que se produce un mayor traumatismo quirúrgico y en aquellos casos en los que hay una infección peritoneal así como la correlación observada entre la concentración postoperatoria de IL-6 y de VEGF proporciona evidencias adicionales que apoyan una relación directa entre la respuesta inflamatoria y la respuesta angiogénica tras cirugía en pacientes con cáncer de colon. Esta correlación positiva entre ambas citoquinas ya se demostró previamente por nuestro grupo en un estudio experimental²³³ y clínico¹³⁶ en los que comparamos la recurrencia tumoral entre cirugía abierta y laparoscópica.

6.2.6. Respuesta angiogénica local a la cirugía: influencia de la infección peritoneal

Los resultados del presente estudio demuestran que durante el postoperatorio de los pacientes intervenidos de cáncer colorrectal se produce un aumento significativo de VEGF en el líquido peritoneal, reflejo de la respuesta angiogénica local que tiene lugar como parte del proceso de curación de las heridas. Además, del mismo modo que ocurrió con la angiogénesis sistémica, la concentración de VEGF en el líquido peritoneal fue significativamente más elevada en los pacientes que presentaron una infección peritoneal en comparación con aquellos que no presentaron complicaciones, tanto a las 48 horas como al cuarto día o en el momento de la infección.

Al igual que ocurrió en el análisis de las muestras de suero, hemos observado una correlación positiva estadísticamente significativa entre la concentración de IL-6 y de VEGF en el líquido peritoneal tanto a las 48 horas como en el 4^o día del postoperatorio. Este hallazgo refuerza la estrecha asociación entre inflamación y angiogénesis tras la resección de un cáncer de colon que hemos observado en estudios previos tanto clínicos como experimentales^{136, 233}.

Hay que destacar también que la respuesta angiogénica local fue muy superior a la sistémica, algo que sucedió también con los niveles de IL-6. Los niveles de VEGF en el líquido peritoneal fueron hasta 5 veces superiores a los determinados en suero. Estos resultados coinciden con los observados anteriormente en varios trabajos en los que se han investigado los cambios que tienen lugar en el perfil de citoquinas pro-angiogénicas en las heridas quirúrgicas. Aunque la elevación del VEGF en la herida operatoria ha sido demostrada recientemente^{132, 234-236}, no es un hallazgo sorprendente ya que la angiogénesis es un fenómeno necesario para proporcionar nutrientes y células inflamatorias en el tejido lesionado.

Para investigar los cambios locales en los niveles de VEGF y otras citoquinas se ha utilizado como modelo intervenciones quirúrgicas en las que habitualmente se deja un drenaje, como la cirugía de pared abdominal^{132, 235} o la cirugía de mama^{234, 236} lo que facilita la obtención de líquido para su análisis. Estos estudios están basados en la premisa de que el líquido del drenaje será representativo del microambiente de la herida. En todos ellos se ha demostrado que, ya durante las primeras horas y los días siguientes a la intervención, ese líquido es potentemente angiogénico. Inmediatamente tras el traumatismo quirúrgico se produce una elevación de los niveles de bFGF seguido de un incremento algo más tardío de VEGF^{214, 236}.

Wu et al.²³⁴ estudiaron los niveles de VEGF y de endostatina, un potente inhibidor de la migración de las células endoteliales, en el líquido de las heridas quirúrgicas y en el plasma en pacientes intervenidos por cáncer de mama y patología benigna. Los autores observaron no sólo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de VEGF en todos los sujetos del estudio sino también un descenso en los niveles de la endostatina. Al igual que en nuestro estudio, los niveles de VEGF en la herida fueron varias veces superiores a los determinados en plasma.

Más recientemente, algunos autores han investigado los cambios en la concentración de diferentes mediadores angiogénicos en la cavidad peritoneal^{131, 142, 237}. Baker et al.¹³¹ determinaron el perfil diario de diferentes citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento en el líquido peritoneal obtenido a través de drenajes tras cirugía electiva por cáncer de colon. Los procedimientos incluidos fueron fundamentalmente resecciones anteriores de recto y sigmoidectomías. Los autores observaron durante el curso postoperatorio inmediato un incremento en la concentración en líquido peritoneal de bFGF seguido de una elevación en los valores de VEGF entre el tercer y cuarto día.

Además del bFGF y del VEGF, se han estudiado otras citoquinas y factores de crecimiento implicados en la angiogénesis local. En un grupo de pacientes a las que se le practicó una mastectomía por cáncer, Baker et al.²³⁸ observaron una elevación precoz a las 24 horas en el líquido del drenaje no sólo de VEGF sino también de PDGF e IL6, tal y como hemos demostrado en el análisis del líquido peritoneal en el presente estudio. Por otra parte, en nuestro estudio hemos observado que esta elevación es mucho más pronunciada en los pacientes que presentaron una infección peritoneal.

Uno de los aspectos de la respuesta angiogénica local que debe ser comentado desde un punto de vista metodológico es la obtención de las muestras del líquido peritoneal. En todos los casos, el líquido fue obtenido a través de un drenaje espirativo cerrado dejado en el lecho quirúrgico. La muestra obtenida correspondía al líquido acumulado en el drenaje durante las últimas horas. No se trata, por lo tanto, del líquido recién obtenido de la cavidad abdominal y ello podría ser considerado un defecto metodológico. Sin embargo, en un estudio en el que Hornbrey et al.²³⁶ investigaron la respuesta angiogénica local en pacientes intervenidas por cáncer de mama demostraron que no había diferencias en la concentración de VEGF determinada mediante técnica de ELISA entre el líquido de la herida quirúrgica recién obtenido y el líquido del drenaje acumulado durante 24 horas. Con estos resultados, los autores concluyeron que la recolección de líquido de drenaje durante 24 horas era un método válido para el estudio de la producción local de VEGF.

6.3 Asociación dehiscencia-recurrencia:

En el presente estudio hemos observado también que la recurrencia tumoral fue mayor en aquellos pacientes que presentaron una infección peritoneal durante el curso postoperatorio en comparación con los pacientes del grupo control

(grupo1: 43% vs. grupo 2: 13%; p<0.001). Del mismo modo, la supervivencia libre de enfermedad fue significativamente menor en el grupo de pacientes con infección. Sin embargo, este estudio no fue diseñado con el objetivo de encontrar diferencias en el resultado oncológico por lo que debemos ser cautos al extraer conclusiones a partir de las diferencias observadas.

A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados coinciden con los de varios estudios de cohortes y casos-contróles publicados en los últimos años que sugieren que la dehiscencia de anastomosis y la consiguiente infección peritoneal se asocian con porcentajes más elevados de recurrencia y con una mayor mortalidad relacionada con el cáncer^{155, 157, 158, 239-242}. McArdle et al.²⁴³ analizaron el impacto de la dehiscencia de anastomosis sobre la supervivencia a largo plazo en una cohorte de 2235 pacientes intervenidos de cáncer de colon y recto. La supervivencia a los 5 años relacionada con el cáncer fue del 42% en pacientes que presentaron una dehiscencia de anastomosis en comparación con el 67% en aquellos que no presentaron una dehiscencia, diferencia estadísticamente significativa. Así, el *hazard ratio* para los pacientes con una dehiscencia en comparación con los que no la tuvieron fue de 1,61 para la supervivencia global y 1,99 para la supervivencia relacionada con el cáncer. En otra serie más reciente de 1580 pacientes que incluía cáncer de colon y recto, 60 pacientes (3,8%) presentaron una dehiscencia de anastomosis¹⁵⁷. La supervivencia a los 5 años relacionada con el cáncer en pacientes con y sin dehiscencia de anastomosis fue del 56,9 y 75,9%, respectivamente, diferencia estadísticamente significativa. La dehiscencia fue un factor independiente asociado con una menor supervivencia en el análisis multivariado. En nuestro estudio también la infección peritoneal así como la afectación ganglionar y la afectación neural fueron factores independientes de recurrencia.

Es interesante señalar como mientras algunos estudios han encontrado una asociación exclusivamente entre infección peritoneal y recurrencia local^{156,157,239,240,244-246,247}. otros han observado esta asociación también con la recurrencia a nivel sistémico^{258,248}. Aunque en nuestro estudio tanto la recurrencia local como sistémica fueron mayores en el grupo de infección peritoneal, sólo la diferencia en el porcentaje de recurrencia sistémica alcanzó la significación estadística. Creemos que ello es debido a que la mayoría de los pacientes incluidos presentaban un cáncer de colon en los que, a diferencia del cáncer de recto, la recurrencia local es poco frecuente por lo que sería necesario un número muy elevado de pacientes para obtener diferencias.

En el estudio de Law et al. la recurrencia a los 5 años en pacientes con y sin dehiscencia fue del 53,8 y 27,2% respectivamente, siendo la dehiscencia un factor independiente asociado con la recurrencia en el análisis multivariado¹⁵⁷. Los autores analizaron además por separado la recurrencia sistémica y local. El porcentaje de ambas formas de recurrencia fue significativamente mayor en aquellos pacientes que presentaron una dehiscencia. El análisis multivariado mostró que la dehiscencia era un factor independiente asociado con la recurrencia sistémica (*hazard ratio* 1,94, IC 95%: 1,23-3,06, $p=0,004$) para todos los pacientes, mientras que fue un factor independiente asociado a la recurrencia local sólo en el subgrupo de pacientes con cáncer de recto.

Chang et al.²⁴⁸ realizaron un estudio retrospectivo sobre 406 pacientes con cáncer de recto, 25 de los cuales presentaron una dehiscencia de anastomosis. Después de un seguimiento medio de 60,5 meses se diagnosticó una recurrencia en 124 pacientes. La incidencia de recurrencia local (20% vs. 8,4%) y también la sistémica (44% vs. 26%) fueron significativamente más elevadas en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia.

Eberhardt et al.²⁴⁹ diseñaron un estudio prospectivo de casos con controles apareados muy similar al nuestro. En este caso, cada paciente con una infección peritoneal, ya fuera un absceso o una dehiscencia de anastomosis, fue apareado con dos pacientes sin infección. Los pacientes fueron intervenidos por un grupo de cirujanos colorrectales con experiencia garantizando de esta forma que se cumplían los criterios de una cirugía oncológica adecuada. Los criterios utilizados para el apareamiento fueron: edad, sexo, estadio tumoral, grado de diferenciación e invasión vascular. Se realizó un análisis por separado del cáncer de colon y recto. En el caso del cáncer de colon se compararon 59 pacientes con infección peritoneal frente a 118 sin infección y no hubo diferencias entre los dos grupos ni siquiera en la administración de quimioterapia adyuvante, variable no incluida como criterio para el apareamiento. No se encontraron diferencias en la recurrencia a los 5 años ni tampoco en la mortalidad global ni relacionada con el cáncer. En el caso del cáncer de recto se compararon 97 pacientes con infección peritoneal con 194 controles y tampoco hubo diferencias en la afectación de los márgenes ni en la administración de neoadyuvancia aunque sí en la administración de quimioterapia postoperatoria, más frecuente en el grupo de pacientes que no presentaron infección peritoneal (35,7 % vs. 8,6 %; $p=0,003$). A los 5 años, la recurrencia local, la recurrencia global y la mortalidad tanto global como relacionada con el cáncer fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes que habían presentado un absceso o dehiscencia.

Branagan et al.²⁴⁴ también analizaron por separado el resultado de la cirugía en el cáncer de colon y en el recto en una serie de 1.834 pacientes intervenidos con intención curativa. El porcentaje de dehiscencia en pacientes con anastomosis colónicas fue del 2,6% y no hubo diferencias en la recurrencia local ni en la supervivencia entre los pacientes que presentaron una dehiscencia y los que no. En cambio, entre los pacientes con anastomosis rectales, la dehiscencia de anastomosis,

que ocurrió en el 6,3% de los casos, se asoció con un mayor porcentaje de recurrencia local.

Fujita et al.²⁴⁰ analizaron la incidencia de recurrencia y el pronóstico de pacientes con dehiscencia de anastomosis en una serie de 1172 pacientes tras cirugía de cáncer de colon y recto. Treinta y tres pacientes presentaron una dehiscencia clínica y/o radiológica y fueron comparados con los otros 947 pacientes sin que hubiera diferencias en las características de los pacientes ni en el estadio tumoral. El porcentaje de recurrencia fue significativamente mayor en aquellos que habían presentado una dehiscencia, a expensas fundamentalmente de un mayor porcentaje de recurrencia local en los pacientes con cáncer de recto.

En un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 331 pacientes con cáncer colorrectal intervenidos con intención curativa, 29 presentaron una dehiscencia de la anastomosis²⁴⁵. Cinco (17,2%) de estos pacientes presentaron una recurrencia local en comparación con sólo 26 (8,6%) de los 302 restantes pacientes, diferencia estadísticamente significativa. El análisis multivariado mostró que la dehiscencia de anastomosis era un factor pronóstico de recurrencia local y de una menor supervivencia relacionada con el cáncer.

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

realización de una exéresis total del mesorrecto o la administración de neoadyuvancia^{239, 240, 245}. Sin embargo, en otro estudio mucho más completo, Ptok et al.¹⁵⁸ analizaron datos recogidos de forma prospectiva sobre 1741 pacientes intervenidos de cáncer de recto. Se incluyeron únicamente pacientes con márgenes negativos y se tuvo en cuenta no sólo variables relacionadas con el paciente o con el tumor sino también otras relacionadas específicamente con el tratamiento recibido como la quimiorradioterapia preoperatoria, la exéresis total del mesorrecto, la ileostomía derivativa o la duración de la cirugía. El análisis de regresión logística de Cox mostró que el estadio tumoral y la dehiscencia de anastomosis, que precisó una reintervención quirúrgica, tenían un efecto independiente sobre la recurrencia local a los 5 años. Es interesante señalar como en este estudio, la dehiscencia de anastomosis que se solucionó con tratamiento conservador no tuvo un efecto independiente sobre la recurrencia. Otros autores han destacado también la asociación entre la reintervención en el postoperatorio inmediato y el resultado oncológico. Khoury et al.²⁴¹ analizaron el resultado de 89 pacientes intervenidos de cáncer de colon y recto que fueron reoperados en el postoperatorio inmediato y los compararon con otros 89 pacientes que no precisaron una reintervención apareados por edad (± 5 años), sexo, año de la cirugía (± 2 años), puntuación según la clasificación ASA, localización del tumor (colon o recto), estadio y grado de diferenciación. La causa de la reintervención fue la dehiscencia o el absceso intraabdominal en la mitad de los pacientes seguida del hemoperitoneo, la obstrucción intestinal y en complicaciones de la herida. La supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fueron significativamente menores entre los pacientes reoperados. Hay que señalar sin embargo, la existencia de factores de confusión como la necesidad de transfusión, mayor entre los pacientes reoperados y la administración de quimioterapia adyuvante que fue menor también en ese grupo. A pesar de estos factores de confusión, los autores consideran que la respuesta

inflamatoria sistémica asociada a la reintervención puede tener un impacto en el resultado oncológico a largo plazo. En este sentido, cuando se incluyó la transfusión y la quimioterapia entre las variables de apareamiento y se realizó un análisis por subgrupos, se observó una menor supervivencia a los 5 años entre los pacientes reoperados por dehiscencia (52% vs. 70.8%; $p=0,19$) y por hemorragia (48,9 vs. 59,3%; $p=0,47$) en comparación con los no reoperados aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. En el presente estudio, sin embargo, no hemos observado diferencias significativas en la recurrencia tumoral entre los pacientes con infección que fueron reoperados y los que fueron tratados de forma conservadora. Ello podría ser debido al número limitado de pacientes, ya que el tamaño de la muestra no se calculó con ese objetivo.

A pesar del número cada vez mayor de trabajos que apoyan esta asociación, otros estudios no la han confirmado por lo que el impacto de la infección peritoneal sobre el resultado oncológico es todavía para algunos autores objeto de controversia^{161, 163, 250, 251}. En un estudio retrospectivo sobre 393 pacientes con cáncer de colon izquierdo y recto intervenidos de forma consecutiva con intención curativa, los autores no encontraron diferencias en la supervivencia global ni en la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años entre aquellos que presentaron una sepsis intra-abdominal y los que no¹⁶¹. Hay que señalar que 5 pacientes que presentaron dehiscencia de anastomosis fueron excluidos por no cumplir unos criterios muy estrictos de sepsis intra-abdominal. Otra de las limitaciones de este estudio es la elevada mortalidad postoperatoria en el grupo de dehiscencia que disminuyó el número de pacientes en los que se realizó seguimiento: 15 (25%) de los 59 pacientes que presentaron una dehiscencia fallecieron en el postoperatorio inmediato en comparación con 17 (5%) de los 334 pacientes sin dehiscencia.

Eriksen et al.¹⁶³ tampoco encontraron ningún efecto de la dehiscencia de anastomosis sobre la recurrencia en un estudio prospectivo sobre 1958 pacientes con cáncer de recto incluidos en el registro nacional de cáncer de recto de Noruega. El porcentaje de dehiscencia fue del 11,6%. La recurrencia local a los 5 años fue 11,6% en el grupo de pacientes con dehiscencia y 10,5% en el grupo sin dehiscencia, diferencia no significativa. La supervivencia a los 5 años fue mayor en los que no presentaron dehiscencia (59% vs. 67,4%; $p=0,021$). Sin embargo, cuando se excluyó del análisis de supervivencia a los pacientes que fallecieron en los primeros 30 días tras la operación no se encontró diferencias entre los dos grupos ($p=0,226$). De Dulk et al.²⁵¹ realizaron un análisis multicéntrico incluyendo pacientes de 5 estudios europeos controlados sobre cirugía del cáncer de recto: Swedish Rectal Cancer Trial, Dutch TME trial, CAO/ARO/AIO-94 trial, EORTC 22921 trial and Polish Rectal Cancer trial. Sobre un total de 5.187 pacientes elegibles se seleccionaron 2.480 sin metástasis en los que se realizó una resección anterior baja y que tenían 75 años o menos. El porcentaje de dehiscencia de anastomosis fue 9,7% y no se encontraron diferencias en variables relacionadas con el resultado oncológico como la recurrencia local, recurrencia sistémica o mortalidad relacionada con el cáncer. Sin embargo, hay que señalar que la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global fueron significativamente menores en los pacientes que presentaron una dehiscencia. Esta disminución en la supervivencia global se observó después de 4 años tras la cirugía, algo para lo que los autores no tienen una explicación. En otro estudio reciente, Jörgren et al.²⁵⁰ seleccionaron pacientes del Swedish Rectal Cancer Trial a los que se les había practicado una resección anterior de recto y que habían presentado una dehiscencia de anastomosis. Estos pacientes ($n=114$) fueron comparados con un grupo control ($n=136$) seleccionado de forma aleatoria entre los pacientes que no presentaron una dehiscencia. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de recurrencia local ni de recurrencia sistémica entre los dos grupos.

Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia acumulada a los 5 años. Sin embargo, es interesante destacar que tanto la recurrencia local y como la sistémica mostraron una tendencia a ocurrir antes en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia. Una importante limitación de este estudio es la forma de selección de los controles puesto que aunque no presentaron dehiscencia pudieron haber presentado otras complicaciones que influyeran en el resultado.

Con el fin de contribuir a aclarar la controversia, se ha publicado recientemente un meta-análisis que incluye 21.092 pacientes a partir de 21 estudios, la mayoría de los cuales hemos mencionado anteriormente, 7 retrospectivos y 14 prospectivos¹⁵⁹. Todos estos estudios describían la influencia de la dehiscencia de anastomosis sobre la recurrencia local o a distancia y sobre la supervivencia específica relacionada con el cáncer tras cirugía con intención curativa del cáncer colorrectal. El meta-análisis de los datos de 13 estudios que presentaban resultados sobre dehiscencia y recurrencia local tras cirugía de cáncer de recto demostró un efecto significativo que favorecía una mayor recurrencia local tras la dehiscencia con un OR de 1,6 (IC 95%=1,33-1,92; p=0,0001). Tres estudios presentaban datos sobre dehiscencia y recurrencia local exclusivamente tras anastomosis colónicas y aunque la recurrencia era mayor en pacientes con dehiscencia la diferencia no fue significativa (OR=2,16; IC 95%=0,88-5,29; p=0,094). Nueve estudios presentaron datos sobre dehiscencia y recurrencia local incluyendo cirugía de colon y recto. El OR de recurrencia local en pacientes en los que se había producido una dehiscencia fue 2,9 (IC 95% = 1,78-4,71; p= 0,0001). Siete de los 21 estudios proporcionaron datos sobre el impacto de la dehiscencia de anastomosis sobre las metástasis a distancia. Aunque el número de recurrencias a distancia fue mayor en los pacientes que habían presentado una dehiscencia, la diferencia no alcanzó la significación estadística (OR = 1,38; IC 95% = 0,96-1,99; p=0,083). Finalmente 14 estudios proporcionaron datos sobre la supervivencia a largo

plazo tras dehiscencia de anastomosis. El meta-análisis de todos estos estudios que incluyó un total de 17.256 pacientes demostró una disminución significativa de la supervivencia específica relacionada con el cáncer después de una dehiscencia con un OR de 1,64 (IC 95%=1,4-1,91;p=0.0001). Tras excluir aquellos estudios en los que no se había ajustado por la mortalidad en el postoperatorio inmediato quedaron 11 estudios cuyo nuevo análisis confirmó la asociación entre dehiscencia y mortalidad a largo plazo relacionada con el cáncer con un OR de 1,75 (IC 95% = 1,47-2,1; p=0.0001). Con todos estos resultados, los autores del meta-análisis concluyen que hay evidencias suficientes para considerar que la dehiscencia de anastomosis tiene un claro efecto adverso sobre el resultado oncológico con una mayor incidencia de recurrencia local y una menor supervivencia a largo plazo tras cirugía del CCR. Los autores consideran que es difícil aportar mejores evidencias dado que se necesita un número muy elevado de pacientes para una complicación cuya incidencia es baja. En este sentido, es interesante destacar que en el presente estudio hemos observado diferencias en el resultado oncológico con sólo 30 pacientes por grupo, cuando en la mayoría de los estudios que han investigado esta asociación el tamaño de la muestra es muy superior. Una posible explicación es que, a diferencia de dichos estudios, el grupo control está seleccionado entre aquellos pacientes que no solamente no presentaron una infección peritoneal sino que no presentaron ningún tipo de complicación durante el postoperatorio, lo que acentúa las diferencias entre ambos grupos. Hay que señalar que la influencia negativa sobre el resultado oncológico a largo plazo no se limita a las infecciones peritoneales sino que incluye también otras complicaciones infecciosas y no infecciosas. Takeuchi et al.²⁵² observaron que la bacteriemia/sepsis tenía un efecto negativo independiente sobre la supervivencia a largo plazo en una serie de 65 pacientes consecutivos a los que se les había practicado una esofagectomía. Del mismo modo, ya en el año 1983 Nowacki y Szymendera¹⁶⁷ observaron que la fiebre post-operatoria que se prolongaba más de

dos días era el factor pronóstico más desfavorable, junto con el estadio tumoral, en una serie de 224 pacientes intervenidos de cáncer colorrectal. En 1987, Teucher y Schindler²⁵³ analizaron de forma retrospectiva una serie de 378 pacientes con cáncer de mama que habían sido intervenidas quirúrgicamente y observaron que el riesgo relativo de recurrencia en aquellas que habían presentado fiebre durante el postoperatorio se incrementaba significativamente: en el estadio II 2,4 veces y en el estadio III 10,6 veces.

La asociación entre infección peritoneal y recurrencia tumoral se ha observado también tras la resección de metástasis hepáticas^{164, 254, 255} y otras neoplasias digestivas. En un estudio reciente en el que se incluyeron 705 pacientes a los que se les había practicado una resección hepática por metástasis de origen colorrectal, la presencia de complicaciones postoperatorias infecciosas fue un factor predictivo independiente de supervivencia libre de enfermedad junto con un número de metástasis superior a 8 y la transfusión sanguínea¹⁶⁴. Hsu et al. observaron también en un estudio retrospectivo de 252 pacientes que el desarrollo de un absceso hepático tras metastasectomía era un factor pronóstico independiente²⁵⁶. Nagasako et al. observaron en una serie de 400 pacientes a los que se les había practicado una gastrectomía por un cáncer gástrico precoz que aquellos que habían presentado una complicaciones en la anastomosis tenían una supervivencia a los 5 años significativamente peor que los que no habían tenido dicha complicación²⁵⁷.

A diferencia de la mayoría de los trabajos publicados, en el presente estudio hemos realizado un análisis por estadios tumorales en el que se observa que las diferencias en recurrencia entre pacientes con y sin infección intraabdominal aparecen tanto en el estadio II como en el estadio III. Nuevamente, la obtención de conclusiones a partir de este resultado debe realizarse con cautela dado que el

estudio no fue diseñado con este objetivo y que el número de pacientes al realizar el análisis por subgrupos es muy bajo. Sin embargo, la confirmación de esta observación en series más largas podría ampliar las indicaciones de tratamiento adyuvante si consideramos que los pacientes en estadio II con una infección peritoneal postoperatoria tienen un peor pronóstico. En un estudio reciente, Katoh et al.²⁵⁸ analizaron específicamente el riesgo de recurrencia sistémica relacionada con la dehiscencia de anastomosis en una serie de 207 pacientes con cáncer colorrectal en estadio II. La dehiscencia ocurrió en 12 (5,8%) pacientes, 5 (3,8%) casos correspondientes a cáncer de colon y 7 (9,2%) a cáncer de recto. La supervivencia acumulada a los 5 años libre de enfermedad fue significativamente peor en aquellos pacientes que habían presentado una dehiscencia en comparación con los que no la habían presentado (58,3% vs. 88,7%; $p < 0,001$). Al realizar el análisis de regresión logística de Cox, la dehiscencia de anastomosis fue el único factor pronóstico. El *hazard ratio* de los pacientes con dehiscencia en comparación con los que no la presentaron fue de 4,38 (IC 95%, 1,66-11,58; $p = 0,003$), lo que indica que la dehiscencia aumentó el riesgo de recurrencia y de muerte relacionada con el cáncer más de 4 veces. Los autores concluyen que se deben realizar nuevos estudios en los que se investigue el beneficio de la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer colorrectal en estadio II que han presentado una dehiscencia de anastomosis. Del mismo modo, el mayor porcentaje de recurrencia en pacientes en estadio III que presentan una infección peritoneal postoperatoria, a pesar de haber recibido en muchos casos quimioterapia, sugiere que es necesario considerar nuevos esquemas de tratamiento adyuvante que mejoren el pronóstico de estos pacientes.

Algunos de los estudios mencionados hasta ahora han incluido no sólo dehiscencias de anastomosis clínicas sino también dehiscencias subclínicas diagnosticadas en estudios radiológicos realizados de rutina. Sin embargo, muy pocos estudios han

incluido pacientes con una infección peritoneal secundaria a un absceso sin dehiscencia. Este es otro de los aspectos que diferencia el presente estudio de la mayoría de los publicados hasta ahora. Sólo dos estudios anteriores consideraron también el absceso intraabdominal como un criterio de inclusión^{162, 249}. En el estudio de Eberhardt et al.²⁴⁹ que hemos mencionado anteriormente se realizó, además del análisis global, un análisis por separado con el objetivo investigar si la dehiscencia de anastomosis tenía un efecto diferente sobre la recurrencia y la mortalidad en comparación con el absceso intraabdominal. Los autores no encontraron diferencias. La recurrencia global a los 5 años fue 25,5% en el grupo de dehiscencia y 20,5% en el grupo de absceso ($p=0,59$). La recurrencia local también fue similar entre los dos grupos (8,3% vs. 14,8%; $p=0,63$). En un estudio retrospectivo con limitaciones metodológicas Kressner et al.¹⁶² observaron que el absceso perineal en pacientes con una amputación de recto se asoció a un mayor porcentaje de recurrencia local, pero no la infección intraabdominal. Al igual que en el estudio de Eberhardt et al.²⁴⁹, no hemos encontrado diferencias en el porcentaje de recurrencia entre los pacientes que presentaron una dehiscencia en comparación con los que presentaron un absceso, aunque debemos insistir de nuevo en que el número de pacientes incluidos no se calculó con ese objetivo. Creemos que es razonable considerar que la influencia de un absceso intraabdominal sobre el resultado oncológico puede ser significativa e incluso mayor que la de una dehiscencia radiológica en un paciente asintomático, especialmente cuando se considera que la respuesta inflamatoria está implicada en esta asociación.

6.4. Mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia

Los resultados del presente estudio sugieren que uno de los mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia es el

incremento observado en la respuesta inflamatoria y en la respuesta angiogénica durante el postoperatorio inmediato. La inflamación y la angiogénesis forman parte de la respuesta biológica a la agresión quirúrgica pero unas respuestas locales y sistémicas muy amplificadas por la infección podrían favorecer la progresión de células tumorales viables a nivel local así como el crecimiento de micrometástasis. La concentración de IL-6 y de VEGF, tanto en suero como en líquido peritoneal, fue más elevada en los pacientes que presentaron una infección peritoneal y se asoció a un mayor porcentaje de recurrencia.

Que el traumatismo quirúrgico puede facilitar, en determinadas circunstancias, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis es conocido desde hace años,²⁵⁹⁻²⁶². Algunos de los mecanismos propuestos que podrían estimular la diseminación metastásica tras la cirugía son la liberación de células tumorales a la circulación, la inflamación, la angiogénesis, la secreción de factores de crecimiento y la inmunosupresión²⁶³, exactamente los mismos que proponemos como responsables de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia. En este sentido, McArdle et al.²⁴³ propusieron la teoría del doble golpe (*double hit*), el primero como resultado del traumatismo quirúrgico con su correspondiente aunque limitada respuesta inflamatoria sistémica y el segundo como resultado de la sepsis, que puede precisar una nueva intervención quirúrgica. En consecuencia, la magnitud y la duración de los mecanismos antes mencionados (inflamación, angiogénesis, inmunosupresión) está aumentada y podría tener un efecto directo sobre el crecimiento de células tumorales residuales²⁶⁴.

En estudios, anteriores al nuestro, se ha investigado también el impacto de la respuesta inflamatoria a la cirugía sobre el resultado oncológico, aunque con

resultados contradictorios. Varios estudios han demostrado que la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica se asocia con una peor supervivencia en pacientes en los que se realiza una resección de cáncer colorrectal con intención curativa^{49, 265}. Katoh et al.²⁵⁸ demostraron en un estudio retrospectivo que la dehiscencia de anastomosis se asociaba de forma significativa con una mayor incidencia de metástasis hematógenas en pacientes con CCR en estadio II. Los autores observaron además que una elevación mantenida de la PCR, 1 ó 2 semanas después de la operación, se asociaba de forma significativa con la dehiscencia y, especialmente, la persistencia de una PCR elevada a las dos semanas era un factor predictivo independiente de un peor pronóstico. Por otra parte, se ha sugerido que una concentración elevada de la PCR puede estar relacionada con una reducción de los linfocitos circulantes, a su vez reflejo de la inmunosupresión que también podría tener un efecto negativo sobre el pronóstico²⁶⁶⁻²⁶⁸.

Durante la respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica y a la infección peritoneal (*double hit*) se liberan varios mediadores proinflamatorios además de la IL-6 y la PCR. Muchos de estos biomarcadores están implicados en la proliferación de células tumorales, supervivencia, inhibición de la apoptosis, progresión a metástasis y resistencia al tratamiento²⁶⁹⁻²⁷³. Un ejemplo es la interleuquina-1 (IL-1), citoquina proinflamatoria que puede favorecer la progresión y el crecimiento del CCR²⁷⁴ y cuya expresión está aumentada en casos avanzados. Otros mediadores proinflamatorios implicados en la asociación entre inflamación y cáncer son la familia de proteínas del factor de necrosis tumoral, la ciclooxigenasa-1 y el factor nuclear kappa B. Se ha demostrado que la transfusión por hemorragia intraoperatoria en pacientes con CCR incrementa la concentración postoperatoria de IL-6 y se asocia a un peor resultado oncológico²⁶³. En este sentido, Mynster et al.²⁷⁵ demostraron que los pacientes en los que precisan transfusión perioperatoria y presentan además una complicación

infecciosa constituyen un grupo con un particular mal pronóstico, independientemente del estadio tumoral.

La hipótesis de que una respuesta inflamatoria aumentada desempeña un papel en la recurrencia tumoral se apoya también en resultados de estudios sobre otras neoplasias. Murphy et al.²⁷⁶ observaron una asociación significativa entre la infección de herida tras cirugía de cáncer de mama y la recurrencia. Más recientemente, Pierce et al.²⁷⁷ estudiaron la asociación entre marcadores de inflamación y la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. En un estudio con 734 pacientes, una elevación de dichos marcadores de inflamación se asoció con una menor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad^{277, 278}. Los resultados de nuestro estudio apoyan también la asociación entre respuesta inflamatoria y progresión tumoral. Al analizar el número total de pacientes incluidos, observamos que la concentración postoperatoria de IL-6 en suero y en líquido peritoneal fue más elevada en los pacientes que presentaron una recurrencia, alcanzando la significación estadística en el cuarto día tras la resección del tumor.

La asociación entre respuesta inflamatoria postoperatoria y recurrencia se ha demostrado no sólo en estudios clínicos sino también en modelos experimentales^{135, 138}. En un modelo experimental de cáncer de colon en ratones, nuestro grupo ha demostrado anteriormente que la mayor respuesta inflamatoria, medida mediante la determinación de IL-6 en suero, se asociaba a una mayor recurrencia tumoral. Se ha demostrado además que la lesión del peritoneo favorece la adhesión y el crecimiento de las células tumorales. Van den Tol et al.¹³⁸ investigaron en un modelo en ratas de traumatismo peritoneal la capacidad de las células inflamatorias peritoneales para favorecer la recurrencia tumoral. Los autores observaron que la adhesión de los neutrófilos a la monocapa de células mesoteliales inducía un daño adicional y

favorecía la exposición de los componentes de la matriz extracelular creando lugares preferenciales de adhesión de las células tumorales libres. Además, la inhibición del flujo de neutrófilos a la cavidad abdominal reducía la recurrencia tumoral.

Aunque otros estudios no han podido demostrar la asociación entre respuesta inflamatoria a la agresión quirúrgica y el resultado oncológico, la mayoría de ellos tiene importantes limitaciones metodológicas. Crozier et al.¹³⁹ investigaron la relación entre la respuesta inflamatoria sistémica preoperatoria y postoperatoria con la supervivencia en pacientes intervenidos de CCR con intención curativa. Se incluyeron 180 pacientes en los que se determinó la concentración de PCR antes y después de la intervención. La presencia de metástasis ganglionares, la hipoalbuminemia y una PCR preoperatoria elevada se asociaron con una menor supervivencia relacionada con el cáncer mientras que la concentración de PCR en el segundo día del postoperatorio no tuvo valor pronóstico significativo. Hay que señalar, sin embargo, que los pacientes con signos de infección fueron excluidos y que no se hace mención a las complicaciones postoperatorias. Richards et al.²⁷⁹ estudiaron el impacto de factores de riesgo perioperatorios, características del tumor y complicaciones postoperatorias sobre la recurrencia tumoral tras cirugía curativa en pacientes con CCR. Los autores no encontraron ninguna asociación entre las complicaciones quirúrgicas y un mayor riesgo de recurrencia. Sin embargo, los autores reconocen en la discusión que hicieron el análisis incluyendo todas las complicaciones y que es posible que sólo las complicaciones infecciosas mayores, como la dehiscencia de anastomosis, tenga una influencia negativa sobre el resultado oncológico. En otro estudio, Wigmore et al.²⁸⁰ determinaron la concentración de PCR antes de la cirugía y a los 3 meses después de la misma en 88 pacientes con CCR a los que siguieron durante un periodo mínimo de 5 años. Los autores observaron una respuesta de fase aguda mantenida a los 3 meses, considerada cuando la PCR era >5 mg/l, en 10 pacientes (11%) sin que ésta

se asociara con un peor resultado oncológico. En nuestra opinión, una de las limitaciones de este estudio es la determinación tan tardía de la PCR. Nuestra hipótesis propone que la asociación con un peor resultado oncológico se produce cuando la respuesta inflamatoria está amplificada durante los primeros días tras la cirugía, como sucede en caso de infección peritoneal. Otros autores coinciden en señalar que el destino de la enfermedad residual se decide en los primeros días tras la resección del tumor por lo que el periodo postoperatorio inmediato puede tener un papel determinante en el resultado oncológico ^{137, 263}.

Además de una respuesta inflamatoria aumentada, nuestra hipótesis propone que un incremento de la respuesta angiogénica postoperatoria puede ser también responsable de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia tumoral en pacientes intervenidos de cáncer de colon con intención curativa. Al igual que ocurrió con la determinación de IL-6, la concentración postoperatoria de VEGF en suero y en líquido peritoneal fue más elevada en los pacientes que presentaron una recurrencia, alcanzando la significación estadística en el cuarto día tras la resección del tumor.

Varios estudios han demostrado que una concentración preoperatoria de VEGF elevada es predictiva de un peor pronóstico en pacientes con CCR ^{92, 95}. Sin embargo, el valor pronóstico de la concentración postoperatoria de VEGF apenas se ha estudiado. Werther K et al. ²⁸¹ investigaron en 318 pacientes consecutivos intervenidos de CCR el valor pronóstico de la concentración de VEGF en suero 6 meses después de la intervención quirúrgica y lo compararon con el valor pronóstico del CEA. Los autores encontraron que la combinación de los valores de VEGF y CEA tenía un mayor valor predictivo de supervivencia global en comparación con la concentración de CEA únicamente.

Estos resultados confirman los obtenidos previamente en nuestro modelo experimental de cáncer de colon e infección peritoneal ¹⁷⁰. En dicho estudio, la concentración de VEGF en suero, la angiogénesis tumoral y la recurrencia fueron significativamente más elevadas en los ratones que presentaron una infección. Esta asociación entre una concentración elevada de VEGF en el postoperatorio y una mayor recurrencia tumoral ya la habíamos observado en otro estudio experimental de nuestro grupo realizado con anterioridad en el que comparamos cirugía abierta y laparoscópica ¹³⁶.

Más recientemente, hemos analizado muestras de suero postoperatorias de 90 pacientes intervenidos de cáncer de colon de forma consecutiva ¹⁴⁸, y hemos encontrado que la concentración de VEGF en suero durante el postoperatorio inmediato es un factor predictivo independiente de recurrencia junto con el estadio tumoral. Además, establecimos un punto de corte en 320 pg/ml. Los pacientes que presentaban una concentración de VEGF superior a esa cifra presentaban una probabilidad 5 veces mayor de presentar una recurrencia tumoral.

De esta forma, la mayor respuesta angiogénica en presencia de una infección peritoneal postoperatoria podría tener un efecto perjudicial en pacientes intervenidos de cáncer. La combinación de células tumorales viables en el lecho quirúrgico ¹⁴⁷, en sangre venosa ²⁸² y en la propia luz intestinal ²⁸³ así como micrometástasis “durmientes” en un estado preangiogénico ²⁸⁴ en presencia de un estímulo angiogénico suficientemente intenso y prolongado durante el período postoperatorio podrían dar lugar a un tumor vascularizado y en consecuencia a una recurrencia local o a distancia.

En relación a la duración del estímulo angiogénico, una de las limitaciones del presente estudio es que las determinaciones de VEGF, tanto en suero como en líquido

peritoneal, se han realizado hasta el 4º día del curso postoperatorio o el día de la infección. Sin embargo, desconocemos la evolución posterior en ambos grupos del estudio. Otros, sin embargo, han investigado los cambios en la concentración sérica de VEGF en un plazo más prolongado. Bondestam et al.¹⁴⁰ investigaron dichos cambios durante los primeros 30 días del postoperatorio y observaron que el VEGF permaneció elevado sólo durante los primeros 6 primeros días postoperatorios retornando a los valores normales posteriormente. En otro de los estudios mencionados anteriormente, la elevación postoperatoria de VEGF ha sido más prolongada, alcanzada un pico máximo a los 14 días y retornando a valores normales después del día 28 tras la intervención¹⁴⁴. De acuerdo con éstos y otros estudios²⁸⁵, la elevación postoperatoria de VEGF se mantiene entre 2 y 3 semanas tras la intervención. Se trata, por lo tanto de un estímulo suficientemente prolongado para favorecer el crecimiento de células residuales y micrometástasis.

En definitiva, los resultados del presente estudio sugieren que unas respuestas inflamatoria y angiogénica exageradas forman parte de los mecanismos implicados en la progresión tumoral asociada a la infección peritoneal postoperatoria. Por ello, es fundamental controlar la agresión quirúrgica y prevenir insultos añadidos como la infección peritoneal. Pero además, la modulación de las respuestas inflamatoria y angiogénica perioperatorias podrían formar parte de la estrategia terapéutica para prevenir la recurrencia tumoral. Por ejemplo, Brivio et al.²⁸⁶ estudiaron la abolición de la hipersercreción postoperatoria de IL-6 mediante la inmunoterapia preoperatoria con IL-2 con el objetivo de prevenir las complicaciones postoperatorias. Se podrían considerar también nuevos esquemas de tratamiento adyuvante que incluyan fármacos anti-angiogénicos que mejoren el pronóstico de estos pacientes, especialmente los que presentan un estadio III. En la actualidad, bevacizumab está indicado únicamente como tratamiento de segunda línea en pacientes con enfermedad

metastásica irresecable. Hasta ahora se ha publicado un único estudio aleatorizado en el que se ha investigado el efecto de bevacizumab como tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de colon en estadios II y III. En dicho estudio la combinación de bevacizumab con fluoracilo, leucovorin y oxaliplatino no aumentó el tiempo libre de enfermedad en comparación con la misma combinación de quimioterápicos sin el anticuerpo monoclonal. Sin embargo, sí que se observó un menor porcentaje de recurrencias durante los 15 meses que duró la exposición a bevacizumab²⁸⁷. Este efecto transitorio sobre la supervivencia libre de enfermedad disminuyó durante el seguimiento posterior hasta que no hubo diferencias entre los dos grupos. Sería interesante analizar específicamente el efecto del tratamiento con bevacizumab en pacientes que han presentado una infección peritoneal.

6.5. ¿Existe una expresión génica de citoquinas característica que se asocie a un mayor riesgo de recurrencia?

En el presente estudio hemos utilizado la determinación de IL-6 y de VEGF como marcadores de inflamación y angiogénesis, respectivamente. Sin embargo, existen muchas otras citoquinas que participan también en la respuesta inflamatoria y angiogénica y muchos otros mediadores que pueden estar implicados en el crecimiento tumoral y cuya expresión puede verse alterada por la infección peritoneal. Por ello, hemos realizado un ensayo preliminar de microarrays de DNA en un número limitado de pacientes en el que se han analizado todos aquellos genes cuya expresión puede estar implicada en la respuesta inflamatoria, en el fenómeno de la angiogénesis y en el crecimiento tumoral.

El estudio ofrece resultados interesantes que deberán ser confirmados posteriormente. Hemos detectado una serie de genes que están sobreexpresados en los pacientes con infección en comparación con los pacientes del grupo control. Entre estos genes, está el OLFM4 (olfactomedin 4) responsable de la secreción de una glicoproteína

conocida como molécula antiapoptótica GW112²⁸⁸. EL OLFM4 está normalmente expresado en la médula ósea, la próstata, intestino delgado, estómago, colon y páncreas²⁸⁸. Niveles elevados de OLFM4 se hallan en el epitelio de las criptas de la mucosa del colon inflamado en enfermedades inflamatorias y en las biopsias gástricas infectadas por *Helicobacter pylori*²⁸⁹. Recientemente, se ha descrito una sobreexpresión de OLFM4 en cáncer de pulmón, próstata²⁹⁰, gástrico²⁹¹ y pancreático²⁹², así como en los adenomas²⁹³ y neoplasias colorectales²⁹⁴. Se ha sugerido que OLFM4 está involucrado en procesos celulares apoptóticos y de crecimiento tumoral. La función celular de OLFM4 está siendo investigada ya que no todos los estudios realizados coinciden. Zhang et al.²⁹⁵ han observado que una sobreexpresión de esta glicoproteína estimula el crecimiento tumoral en neoplasias de próstatas en ratones con tumores singénicos C57/BL6 pero, sin embargo, inhibe la proliferación celular PC-3 en neoplasias de próstata en humanos²⁹⁶. En cambio, una sobreexpresión de OLFM4 tiene una importante actividad antiapoptótica en las células endoteliales venosas SVEC y en células de adenocarcinoma en humanos HeLa²⁹⁵. Diferentes estudios han sugerido que la actividad antiapoptótica y de crecimiento tumoral de esta glicoproteína depende del tipo tisular o celular^{293, 296}. Esta sobreexpresión de OLFM4 observada en el grupo con infección peritoneal podría explicar la mayor recurrencia tumoral observada en estos pacientes debido a la función antiapoptótica²⁹⁴ de esta glicoproteína que estimularía el crecimiento tumoral.

Otro de los genes sobreexpresados en el grupo de infección es la MMP8, es una proteína de la familia de las metaloproteinasas (MMP). Las MMPs se han relacionado clásicamente con la patogénesis del cáncer promoviendo la invasión y las metástasis²⁹⁷. Más recientemente se ha observado que están implicados en otros procesos de la carcinogénesis como la regulación de la señal de crecimiento celular, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune²⁹⁷. En general, una mayor sobreexpresión de

determinadas MMPs se asocia a una peor supervivencia en muchos tipos de cáncer²⁹⁸. Específicamente en el cáncer colorrectal se han estudiado diferentes MMPs como la MMP-1²⁹⁹, MMP-9²⁹⁹ y TIMP-1³⁰⁰ que se asocian a un peor pronóstico de estos pacientes. Sin embargo la MMP-8 no ha sido muy estudiada en el cáncer colorectal. La MMP-8 se expresa en una amplia variedad de grupos celulares como los neutrófilos, los macrófagos, las células plasmáticas, los linfocitos T, fibroblastos y células epiteliales³⁰¹. En algunos estudios se ha evidenciado que la expresión local aumentada de MMP-8 se correlacionaba positivamente con el estadio, grado tumoral y un peor pronóstico, como el cáncer de ovario³⁰². En cambio otros grupos han evidenciado que la falta de expresión de este gen se asociaba a mayor susceptibilidad para desarrollar diferentes tipos de tumores como ciertos tumores de piel³⁰³. Estas diferencias podrían indicar diferentes funciones de la MMP-8 en función del tipo de tejido afecto. Un estudio reciente de Väyrynen et al.³⁰¹ han evidenciado que la MMP-8 está involucrado en la evolución y progresión del cáncer colorrectal en relación con la respuesta inmune propia del tumor. Niveles elevados de MMP-8 se asociaba a mayor neutrofilia en sangre y a metástasis a distancia. La MMP-8 se correlaciona con los leucocitos en sangre periférica. La mayor expresión de esta proteína promueve el reclutamiento de neutrófilos a nivel local para resolver la fase inflamatoria aguda y crónica peritumoral provocando la necrosis tumoral. La asociación entre niveles elevados de MMP-8 y la necrosis tumoral se ha observado en un modelo experimental³⁰³. El aumento de esta proteína podría ayudar a resolver la inflamación aguda y crónica peritumoral favoreciendo que las células tumorales escaparan de la inmunoregulación³⁰¹. Por lo que podríamos pensar que una sobreexpresión de más del doble de este gen en el grupo de infección en comparación con el grupo control podría estar en relación con la mayor respuesta inflamatoria observada en estos pacientes y por consiguiente de la mayor progresión tumoral.

Otro de los genes más sobreexpresados es el CD177, una proteína que está relacionada con procesos inflamatorios, incluido infecciones bacterianas, y como factor estimulador de colonias de granulocitos. Se conoce que la proteína CD177 se une al receptor heterofílico PECAM-1 de las células endoteliales favoreciendo la migración de células inflamatorias, específicamente la trans migración de los neutrófilos ³⁰⁴.

El GPR84 es un receptor de la cadena media de ácidos grasos (MCFAs) cuya función no se conoce con detalle. Se ha observado que con determinados ligandos como 6-OAU (6-n-octylaminouracil) promueve la quimiotaxis de las células polimorfonucleares y macrófagos, amplificando la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-8 y el TNF. Por lo tanto la GRP84 juega un papel importante en la respuesta proinflamatoria ³⁰⁵. Recientemente Ogami et al. ³⁰⁶ han observado que el aumento de expresión de TNF induce la angiogenesis.

La sobreexpresión de estos genes implicados principalmente en la respuesta inflamatoria y angiogénica refuerza la importancia de estos dos mecanismos en los pacientes que presentan una infección peritoneal y la probable asociación a la mayor recurrencia tumoral observada en este grupo.

Desde el punto de vista metodológico hay que destacar varios aspectos. Una de las limitaciones del ensayo es que se ha realizado únicamente en muestras de suero del día 4 del postoperatorio o del momento de la infección, pero no con muestras basales, por lo que desconocemos el estado de expresión de dichos genes antes de la intervención quirúrgica. Sin embargo, el hecho de que las características de los pacientes de los dos grupos sean muy similares al estar apareados hace que las diferencias observadas en el postoperatorio sean relevantes.

Por otra parte, hay que señalar que la purificación del RNA para el ensayo de arrays con muestras de suero presenta algunas dificultades. Aunque es posible aislar RNA circulante, éste se encuentra en cantidades muy bajas lo que hace muy difícil su purificación para el ensayo ³⁰⁷. Por ese motivo, decidimos aislar el RNA de los leucocitos aislados en suero. Es evidente que se trata de sólo una de las fracciones celulares existentes en el suero, pero es cierto que es una de las más importantes en la producción de citoquinas implicadas en la respuesta inflamatoria y angiogénesis por lo que creemos que los resultados son representativos de los cambios que la infección postoperatoria induce en la expresión de determinados genes.

7. CONCLUSIONES

1. La infección peritoneal postoperatoria induce un incremento en la expresión de IL-6 y VEGF en suero y en líquido peritoneal en pacientes con CCR intervenidos con intención curativa. El incremento en la concentración de estas citoquinas refleja un aumento de la respuesta inflamatoria y de la respuesta angiogénica, sistémica y local.
2. Existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre la respuesta inflamatoria y la respuesta angiogénica.
3. La infección peritoneal, tanto en forma de dehiscencia de anastomosis como de absceso intraabdominal, es un factor predictivo independiente de recurrencia tumoral.
4. La amplificación en la respuesta inflamatoria y angiogénica durante el postoperatorio inmediato es uno de los posibles mecanismos responsables de la asociación entre infección peritoneal y recurrencia.
5. El estudio mediante microarrays de DNA permite identificar en pacientes con CCR que presentan una infección peritoneal postoperatoria algunos genes que podrían estar relacionados con la inflamación, la angiogénesis y la recurrencia.

8. ANEXOS

8.1 Información para el paciente

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

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

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

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

inflamatoria es mayor en aquellos pacientes con cáncer de colon operados de urgencias con peritonitis.

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

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

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

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

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

8.2 Consentimiento informado

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

Yo (nombre y apellidos en mayúsculas)

He leído la hoja de información que se me ha entregado

He podido hacer preguntas sobre el estudio

He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con: (nombre del investigador en mayúsculas)

Comprendo que:

1. Mi participación es voluntaria

2. Que no me supone ningún beneficio directo

3. Que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mis

cuidados médicos

4. Que la información obtenida de este estudio es confidencial

Autorizo mi inclusión en este estudio

Fecha

Firma del participante

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.
2. Winawer SJ FR, Miller L, Godlee F et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. 1997 Feb;112(2):594-642.
3. Ferlay J, Randi G, Bosetti C, et al. Declining mortality from bladder cancer in Europe. *BJU Int* 2008; 101(1):11-9.
4. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, et al. EURO-CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 2009; 45(6):931-91.
5. Helfand M MK, Zimmer-Gembeck MJ, Sox HC, Jr. History of visible rectal bleeding in a primary care population. Initial assessment and 10-year follow-up. *Jama*. 1997 Jan 1;277(1):44-8.
6. Hughes TG JE, Poulos E. Intramural spread of colon carcinoma. A pathologic study. *Am J Surg* 1983 Dec;146(6):697-9.
7. Jemal A SR, Ward E, Murray T, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007 Jan-Feb;57(1):43-66.
8. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*; 17(6):1471-4.
9. Nicholls. RJDR. *Surgery of the colon and rectum*, 2000.
10. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69(10):613-6.

11. Nivatvongs Ga. Principles and Practice of Surgery for the colon, rectum and anus, 2007.
12. Hermanek P, Hermanek P, Hohenberger W, et al. The pathological assessment of mesorectal excision: implications for further treatment and quality management. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18(4):335-41.
13. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(20):2050-9.
14. Hazebroek EJ. COLOR: a randomized clinical trial comparing laparoscopic and open resection for colon cancer. *Surg Endosc* 2002; 16(6):949-53.
15. van der Pas MH, Haglind E, Cuesta MA, et al. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer (COLOR II): short-term outcomes of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*; 14(3):210-8.
16. Atkin G CA, Mitchell I. Colorectal cancer metastasis: in the surgeon's hands? *Int Semin Surg Oncol* 2005 Feb 24;2(1):5.
17. Harris GJ CJ, Senagore AJ, Lavery IC et al. Factors affecting local recurrence of colonic adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2002 Aug;45(8):1029-34.
18. Ramirez-Rodriguez JM A-DV. [Local recurrence in colon and rectal cancer]. *Cir Esp* 2005 Dec;78(6):344-50.
19. Peracchia A SL, Carreras F, Pietra N et al. [Locoregional recurrences following curative surgery for colon cancer]. *Ann Ital Chir*. 1991 Jan-Feb;62(1):37-42; discussion 3-4.
20. Devesa JM MV, Enriquez JM, et al. . Colorectal cancer. The bases for a comprehensive follow-up. *Dis Colon Rectum* 1988; 31:636-52.
21. Derwinger K, Gustavsson B. Variations in demography and prognosis by colon cancer location. *Anticancer Res*; 31(6):2347-50.

22. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol*; 29(33):4401-9.
23. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J*; 59(6):A4444.
24. Trakarnsanga A, Gonen M, Shia J, et al. What is the Significance of the Circumferential Margin in Locally Advanced Rectal Cancer After Neoadjuvant Chemoradiotherapy? *Ann Surg Oncol*; 20(4):1179-84.
25. Compton CC. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 2(3):149-60.
26. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16(4):376-88.
27. Hamilton SR VB, Kudo S. et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton et al, editors. Lyon, France: IARC Press, 2000.
28. Redston. Epithelial neoplasms of the large intestine. In Odze RD, editor. *Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas*. Philadelphia: Saunders, 2009:597-637.
29. Lanza G, Messerini L, Gafa R, Risio M. Colorectal tumors: the histology report. *Dig Liver Dis* 2011, Vol. 43 Suppl 4. pp. S344-55.
30. PT. AD. Clinical aspects of sporadic colorectal cancer. *Gastrointestinal cancers* 2003; Philadelphia: Saunders:379-405.
31. Washington MK, Berlin J, Branton P, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133(10):1539-51.
32. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1997; 112(4):1096-102.

33. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end results and rectal pooled analysis outcomes. *J Clin Oncol*; 28(2):256-63.
34. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*; 28(2):264-71.
35. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(6):433-41.
36. Morris EJ, Maughan NJ, Forman D, Quirke P. Identifying stage III colorectal cancer patients: the influence of the patient, surgeon, and pathologist. *J Clin Oncol* 2007; 25(18):2573-9.
37. Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Am J Clin Pathol* 2008; 129(1):13-23.
38. Sjo OH, Merok MA, Svindland A, Nesbakken A. Prognostic impact of lymph node harvest and lymph node ratio in patients with colon cancer. *Dis Colon Rectum*; 55(3):307-15.
39. Messerini L, Cianchi F, Cortesini C, Comin CE. Incidence and prognostic significance of occult tumor cells in lymph nodes from patients with stage IIA colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2006; 37(10):1259-67.
40. Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, et al. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(4):300-4.
41. Puppa G, Ueno H, Kayahara M, et al. Tumor deposits are encountered in advanced colorectal cancer and other adenocarcinomas: an expanded

- classification with implications for colorectal cancer staging system including a unifying concept of in-transit metastases. *Mod Pathol* 2009; 22(3):410-5.
42. Horn A, Dahl O, Morild I. The role of venous and neural invasion on survival in rectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 1990; 33(7):598-601.
 43. Sato T, Ueno H, Mochizuki H, et al. Objective criteria for the grading of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*; 34(4):454-62.
 44. Dirschmid K, Lang A, Mathis G, et al. Incidence of extramural venous invasion in colorectal carcinoma: findings with a new technique. *Hum Pathol* 1996; 27(11):1227-30.
 45. Liebig C, Ayala G, Wilks J, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(31):5131-7.
 46. Fearon KC, McMillan DC, Preston T, et al. Elevated circulating interleukin-6 is associated with an acute-phase response but reduced fixed hepatic protein synthesis in patients with cancer. *Ann Surg* 1991; 213(1):26-31.
 47. Read JA, Choy ST, Beale PJ, Clarke SJ. Evaluation of nutritional and inflammatory status of advanced colorectal cancer patients and its correlation with survival. *Nutr Cancer* 2006; 55(1):78-85.
 48. Leitch EF, Chakrabarti M, Crozier JE, et al. Comparison of the prognostic value of selected markers of the systemic inflammatory response in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(9):1266-70.
 49. McMillan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003; 90(2):215-9.
 50. McMillan DC, Wotherspoon HA, Fearon KC, et al. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 1995; 170(4):319-22.

51. Kaminska J, Nowacki MP, Kowalska M, et al. Clinical significance of serum cytokine measurements in untreated colorectal cancer patients: soluble tumor necrosis factor receptor type I--an independent prognostic factor. *Tumour Biol* 2005; 26(4):186-94.
52. Chung YC, Chang YF. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2003; 83(4):222-6.
53. Roxburgh CS, McMillan DC. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*; 38(5):451-66.
54. Sharma A, Greenman J, Sharp DM, et al. Vascular endothelial growth factor and psychosocial factors in colorectal cancer. *Psychooncology* 2008; 17(1):66-73.
55. Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, Kubota K. Influence of inflammation-based prognostic score on mortality of patients undergoing chemotherapy for far advanced or recurrent unresectable colorectal cancer. *Ann Surg* 2009; 250(2):268-72.
56. Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer. *Arch Surg* 1997; 132(5):541-6.
57. Frank RE ST, Leurgans et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222(6):541-6.
58. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57(6):1043-6.
59. Tien YW, Chang KJ, Jeng YM, et al. Tumor angiogenesis and its possible role in intravasation of colorectal epithelial cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1627-32.

60. Bossi P, Viale G, Lee AK, et al. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55(21):5049-53.
61. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175(3):409-16.
62. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(1):4-6.
63. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801):249-57.
64. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004; 8(3):294-300.
65. Dredge K, Dalglish AG, Marriott JB. Recent developments in antiangiogenic therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2(8):953-66.
66. Mauriz JL, Linares P, Gonzalez P, Culebras JM. [Antiangiogenic treatment of cancer]. *Cir Esp* 2005; 78(1):3-11.
67. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-64.
68. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):401-10.
69. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(4):273-86.
70. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999; 5(3):487-91.
71. Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(7):978-85.

72. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23(5):1011-27.
73. Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol* 2003; 200(2):183-94.
74. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146(5):1029-39.
75. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359(6398):843-5.
76. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(26):15809-14.
77. Rossler J, Breit S, Havers W, Schweigerer L. Vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma: up-regulation by hypoxia. *Int J Cancer* 1999; 81(1):113-7.
78. Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, et al. Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors. *Neoplasia* 2001; 3(6):500-8.
79. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5(1):24-33.
80. Decaussin M, Sartelet H, Robert C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999; 188(4):369-77.

81. Lacal PM, Failla CM, Pagani E, et al. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 2000; 115(6):1000-7.
82. Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999; 54(3):567-72.
83. Dias S, Hattori K, Heissig B, et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19):10857-62.
84. Price DJ, Miralem T, Jiang S, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12(3):129-35.
85. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(21):1603-12.
86. Brawer MK, Deering RE, Brown M, et al. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* 1994; 73(3):678-87.
87. Fontanini G, Bigini D, Vignati S, et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 1995; 177(1):57-63.
88. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, et al. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177(3):275-83.
89. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13(2):477-81.
90. Aotake T, Lu CD, Chiba Y, et al. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 1999; 5(1):135-42.

91. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, et al. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1996; 77(8 Suppl):1722-8.
92. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55(18):3964-8.
93. Sulkowska M, Famulski W, Wincewicz A, et al. Levels of VE-cadherin increase independently of VEGF in preoperative sera of patients with colorectal cancer. *Tumori* 2006; 92(1):67-71.
94. Werther K, Christensen IJ, Brunner N, Nielsen HJ. Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. The Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26(7):657-62.
95. Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Huget P, et al. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(2):316-22.
96. Kabbinavar F HH, Fehrenbacher L, Meropol NJ, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21((1)):60-5.
97. Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, et al. Biology of angiogenesis in tumors of the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 2003; 60(2):199-207.
98. Nakayama Y, Sako T, Shibao K, et al. Prognostic value of plasma vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002; 22(4):2437-42.
99. Takahashi Y, Ellis LM, Mai M. The angiogenic switch of human colon cancer occurs simultaneous to initiation of invasion. *Oncol Rep* 2003; 10(1):9-13.
100. George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001; 3(5):420-7.

101. Kondo Y, Aii S, Mori A, et al. Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):622-30.
102. Kuniyasu H, Yasui W, Shinohara H, et al. Induction of angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *Am J Pathol* 2000; 157(5):1523-35.
103. White JD HP, Kosuge D, McCulloch T, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002 Mar 15; 62((6)):1669-75.
104. Wibe A, Rendedal PR, Svensson E, et al. Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89(3):327-34.
105. Otchy D, Hyman NH, Simmang C, et al. Practice parameters for colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(8):1269-84.
106. Staib L, Link KH, Blatz A, Beger HG. Surgery of colorectal cancer: surgical morbidity and five- and ten-year results in 2400 patients--monoinstitutional experience. *World J Surg* 2002; 26(1):59-66.
107. Bokey EL, Chapuis PH, Dent OF, et al. Surgical technique and survival in patients having a curative resection for colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46(7):860-6.
108. West NP, Morris EJ, Rotimi O, et al. Pathology grading of colon cancer surgical resection and its association with survival: a retrospective observational study. *Lancet Oncol* 2008; 9(9):857-65.
109. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, et al. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis* 2009; 11(4):354-64; discussion 364-5.

110. Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R, Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(22):3570-5.
111. Liang JT, Huang KC, Lai HS, et al. Oncologic results of laparoscopic D3 lymphadenectomy for male sigmoid and upper rectal cancer with clinically positive lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(7):1980-90.
112. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, et al. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 1992; 79(8):757-60.
113. Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg* 1996; 83(8):1031-6.
114. Kinnaert P, De Wilde JP, Bournonville B, et al. Direct activation of human peritoneal mesothelial cells by heat-killed microorganisms. *Ann Surg* 1996; 224(6):749-54; discussion 754-5.
115. Diamantstein T, Handschumacher RE, Oppenheim JJ, et al. Nonspecific "lymphocyte activating" factors produced by macrophages. *J Immunol* 1979; 122(6):2633-5.
116. Ritchie DG, Fuller GM. Hepatocyte-stimulating factor: a monocyte-derived acute-phase regulatory protein. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408:490-502.
117. Koj A, Gauldie J, Regoeczi E, et al. The acute-phase response of cultured rat hepatocytes. System characterization and the effect of human cytokines. *Biochem J* 1984; 224(2):505-14.
118. Gauldie J, Richards C, Harnish D, et al. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(20):7251-5.
119. J. VS. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:253-78.

120. Kato K, Yokoi T, Takano N, et al. Detection by in situ hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. *J Immunol* 1990; 144(4):1317-22.
121. Cicco NA, Lindemann A, Content J, et al. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 1990; 75(10):2049-52.
122. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, et al. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 1989; 19(4):689-94.
123. Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, et al. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 1989; 49(1):102-6.
124. Fong Y, Moldawer LL, Marano M, et al. Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man. *J Immunol* 1989; 142(7):2321-4.
125. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74(5):1704-10.
126. Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, et al. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond)* 1990; 79(2):161-5.
127. Delgado S, Lacy AM, Filella X, et al. Acute phase response in laparoscopic and open colectomy in colon cancer: randomized study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(5):638-46.
128. Ordemann J, Jacobi CA, Schwenk W, et al. Cellular and humoral inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections. *Surg Endosc* 2001; 15(6):600-8.

129. Leung KL, Lai PB, Ho RL, et al. Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma: A prospective randomized trial. *Ann Surg* 2000; 231(4):506-11.
130. Wu FP, Sietses C, von Blomberg BM, et al. Systemic and peritoneal inflammatory response after laparoscopic or conventional colon resection in cancer patients: a prospective, randomized trial. *Dis Colon Rectum* 2003; 46(2):147-55.
131. Baker EA, El Gaddal S, Aitken DG, Leaper DJ. Growth factor profiles in intraperitoneal drainage fluid following colorectal surgery: relationship to wound healing and surgery. *Wound Repair Regen* 2003; 11(4):261-7.
132. Di Vita G, Patti R, D'Agostino P, et al. Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair. *Wound Repair Regen* 2006; 14(3):259-64.
133. Harmon GD, Senagore AJ, Kilbride MJ, Warzynski MJ. Interleukin-6 response to laparoscopic and open colectomy. *Dis Colon Rectum* 1994; 37(8):754-9.
134. Vittimberga FJ, Jr., Foley DP, Meyers WC, Callery MP. Laparoscopic surgery and the systemic immune response. *Ann Surg* 1998; 227(3):326-34.
135. Pera M, Nelson H, Rajkumar SV, et al. Influence of postoperative acute-phase response on angiogenesis and tumor growth: open vs. laparoscopic-assisted surgery in mice. *J Gastrointest Surg* 2003; 7(6):783-90.
136. Pascual M, Alonso S, Pares D, et al. Randomized clinical trial comparing inflammatory and angiogenic response after open versus laparoscopic curative resection for colonic cancer. *Br J Surg*; 98(1):50-9.
137. Nowacki MP, Janik P, Nowacki PM. Inflammation and metastases. *Med Hypotheses* 1996; 47(3):193-6.

138. van den Tol MP, ten Raa S, van Grevenstein WM, et al. The post-surgical inflammatory response provokes enhanced tumour recurrence: a crucial role for neutrophils. *Dig Surg* 2007; 24(5):388-94.
139. Crozier JE, McKee RF, McArdle CS, et al. Preoperative but not postoperative systemic inflammatory response correlates with survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 2007; 94(8):1028-32.
140. Bondestam J, Salven P, Jaaskela-Saari H, et al. Major surgery increases serum levels of vascular endothelial growth factor only temporarily. *Am J Surg* 2000; 179(1):57-9.
141. Svensen CH. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in plasma increases after hip surgery. *J Clin Anesth* 2004; 16(6):435-9.
142. Wu FP, Westphal JR, Hoekman K, et al. The effects of surgery, with or without rhGM-CSF, on the angiogenic profile of patients treated for colorectal carcinoma. *Cytokine* 2004; 25(2):68-72.
143. Curigliano G, Petit JY, Bertolini F, et al. Systemic effects of surgery: quantitative analysis of circulating basic fibroblast growth factor (bFGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) in patients with breast cancer who underwent limited or extended surgery. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93(1):35-40.
144. Futami R, Miyashita M, Nomura T, et al. Increased serum vascular endothelial growth factor following major surgical injury. *J Nihon Med Sch* 2007; 74(3):223-9.
145. Svendsen MN, Werther K, Christensen IJ, et al. Influence of open versus laparoscopically assisted colectomy on soluble vascular endothelial growth factor (sVEGF) and its soluble receptor 1 (sVEGFR1). *Inflamm Res* 2005; 54(11):458-63.

146. Whelan RL. Open versus laparoscopy assisted colectomy. *Lancet* 2003; 361(9351):75; author reply 75-6.
147. Hansen E, Wolff N, Knuechel R, et al. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg* 1995; 130(4):387-93.
148. M. Pascual, S. Alonso, MJ. Gil, et al. Angiogenic response to surgery in patients after colon resection and its correlations with oncological result on long term follow up. *Colorectal Dis* 2012; 14((supl2)):8-15.
149. Chambers WM, Mortensen NJ. Postoperative leakage and abscess formation after colorectal surgery. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(5):865-80.
150. Martinez-Serrano MA, Pares D, Pera M, et al. Management of lower gastrointestinal bleeding after colorectal resection and stapled anastomosis. *Tech Coloproctol* 2009; 13(1):49-53.
151. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairy G, et al. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *Br J Surg* 2001; 88(9):1157-68.
152. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, et al. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg* 1998; 85(3):355-8.
153. Alves A, Panis Y, Trancart D, et al. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World J Surg* 2002; 26(4):499-502.
154. Golub R, Golub RW, Cantu R, Jr., Stein HD. A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. *J Am Coll Surg* 1997; 184(4):364-72.
155. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg*, Vol. 240, 2004. pp. 255-9.

156. Merkel S, Wang WY, Schmidt O, et al. Locoregional recurrence in patients with anastomotic leakage after anterior resection for rectal carcinoma. *Colorectal Dis* 2001; 3(3):154-60.
157. Law WL, Choi HK, Lee YM, et al. Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patients after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg* 2007; 11(1):8-15.
158. Ptok H, Marusch F, Meyer F, et al. Impact of anastomotic leakage on oncological outcome after rectal cancer resection. *Br J Surg* 2007; 94(12):1548-54.
159. Mirnezami A, Mirnezami R, Chandrakumaran K, et al. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg*; 253(5):890-9.
160. Phillips RK, Hittinger R, Blesovsky L, et al. Local recurrence following 'curative' surgery for large bowel cancer: II. The rectum and rectosigmoid. *Br J Surg* 1984; 71(1):17-20.
161. Varty PP, Linehan IP, Boulos PB. Intra-abdominal sepsis and survival after surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 1994; 81(6):915-8.
162. Kressner U, Graf W, Mahteme H, et al. Septic complications and prognosis after surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002; 45(3):316-21.
163. Eriksen MT, Wibe A, Norstein J, et al. Anastomotic leakage following routine mesorectal excision for rectal cancer in a national cohort of patients. *Colorectal Dis* 2005; 7(1):51-7.
164. Farid SG, Aldouri A, Morris-Stiff G, et al. Correlation between postoperative infective complications and long-term outcomes after hepatic resection for colorectal liver metastasis. *Ann Surg*; 251(1):91-100.

165. Ito H, Are C, Gonen M, et al. Effect of postoperative morbidity on long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 2008; 247(6):994-1002.
166. Lerut T, Moons J, Coosemans W, et al. Postoperative complications after transthoracic esophagectomy for cancer of the esophagus and gastroesophageal junction are correlated with early cancer recurrence: role of systematic grading of complications using the modified Clavien classification. *Ann Surg* 2009; 250(5):798-807.
167. Nowacki MP, Szymendera JJ. The strongest prognostic factors in colorectal carcinoma. Surgicopathologic stage of disease and postoperative fever. *Dis Colon Rectum* 1983; 26(4):263-8.
168. Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(7):2803-7.
169. Bresalier RS, Hujanen ES, Raper SE, et al. An animal model for colon cancer metastasis: establishment and characterization of murine cell lines with enhanced liver-metastasizing ability. *Cancer Res* 1987; 47(5):1398-406.
170. Bohle B, Pera M, Pascual M, et al. Postoperative intra-abdominal infection increases angiogenesis and tumor recurrence after surgical excision of colon cancer in mice. *Surgery*; 147(1):120-6.
171. Gil-Egea MJ, Martinez MA, Sanchez M, et al. [Multimodal rehabilitation programme in elective colorectal surgery. Development of a clinical pathway and preliminary results]. *Cir Esp* 2008; 84(5):251-5.
172. Salvans S, Gil-Egea MJ, Martinez-Serrano MA, et al. [Multimodal (fast-track) rehabilitation in elective colorectal surgery: evaluation of the learning curve with 300 patients]. *Cir Esp*; 88(2):85-91.

173. Rafael. A. Irizarry BMB, Francois Collin, Leslie M. Cope, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data *Nucleic Acids Research* Speed (2003), ; 31(4):e15.
174. Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3 2004; No. 1, Article 3.
175. Benjamini YaH. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B*.57:289–300 1995.
176. Bullard KM, Trudel JL, Baxter NN, Rothenberger DA. Primary perineal wound closure after preoperative radiotherapy and abdominoperineal resection has a high incidence of wound failure. *Dis Colon Rectum* 2005; 48(3):438-43.
177. Smith RL, Bohl JK, McElearney ST, et al. Wound infection after elective colorectal resection. *Ann Surg* 2004; 239(5):599-605; discussion 605-7.
178. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, et al. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13(10):606-8.
179. Pujol M, Limon E, Lopez-Contreras J, et al. Surveillance of surgical site infections in elective colorectal surgery. Results of the VINCat Program (2007-2010). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 30 Suppl 3:20-5.
180. Nichols RL, Choe EU, Weldon CB. Mechanical and antibacterial bowel preparation in colon and rectal surgery. *Chemotherapy* 2005; 51 Suppl 1:115-21.
181. Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Elective colon and rectal surgery differ in risk factors for wound infection: results of prospective surveillance. *Ann Surg* 2006; 244(5):758-63.

182. Serra-Aracil X, Garcia-Domingo MI, Pares D, et al. Surgical site infection in elective operations for colorectal cancer after the application of preventive measures. *Arch Surg*; 146(5):606-12.
183. Tang R, Chen HH, Wang YL, et al. Risk factors for surgical site infection after elective resection of the colon and rectum: a single-center prospective study of 2,809 consecutive patients. *Ann Surg* 2001; 234(2):181-9.
184. Law WL, Chu KW. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: a prospective evaluation of 622 patients. *Ann Surg* 2004; 240(2):260-8.
185. Ishihara S, Watanabe T, Akahane T, et al. Tumor location is a prognostic factor in poorly differentiated adenocarcinoma, mucinous adenocarcinoma, and signet-ring cell carcinoma of the colon. *Int J Colorectal Dis*; 27(3):371-9.
186. Isbister WH. Anastomotic leak in colorectal surgery: a single surgeon's experience. *ANZ J Surg* 2001; 71(9):516-20.
187. Rahbari NN, Weitz J, Hohenberger W, et al. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: a proposal by the International Study Group of Rectal Cancer. *Surgery*; 147(3):339-51.
188. Virginali A FW, Lavery IC et al. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1014 patients. *J Am Coll Surg* 1997; 185:185-186.
189. Law WI, Chu KW, Ho JW, Chan CW. Risk factors for anastomotic leakage after low anterior resection with total mesorectal excision. *Am J Surg* 2000; 179(2):92-6.
190. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 1987; 30(11):867-71.
191. Dworkin MJ, Allen-Mersh TG. Effect of inferior mesenteric artery ligation on blood flow in the marginal artery-dependent sigmoid colon. *J Am Coll Surg* 1996; 183(4):357-60.

192. Hall NR, Finan PJ, Stephenson BM, et al. High tie of the inferior mesenteric artery in distal colorectal resections--a safe vascular procedure. *Int J Colorectal Dis* 1995; 10(1):29-32.
193. Nicksa GA, Dring RV, Johnson KH, et al. Anastomotic leaks: what is the best diagnostic imaging study? *Dis Colon Rectum* 2007; 50(2):197-203.
194. Pera M, Delgado S, Garcia-Valdecasas JC, et al. The management of leaking rectal anastomoses by minimally invasive techniques. *Surg Endosc* 2002; 16(4):603-6.
195. Fraccalvieri D, Biondo S, Saez J, et al. Management of colorectal anastomotic leakage: differences between salvage and anastomotic takedown. *Am J Surg*; 204(5):671-6.
196. Damrauer SM, Bordeianou L, Berger D. Contained anastomotic leaks after colorectal surgery: are we too slow to act? *Arch Surg* 2009; 144(4):333-8; discussion 338.
197. Canna K, Hilmy M, McMillan DC, et al. The relationship between tumour proliferative activity, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2008; 10(7):663-7.
198. Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N, et al. Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery. *Surgery* 1992; 111(2):201-9.
199. Targarona EM, Pons MJ, Balague C, et al. Acute phase is the only significantly reduced component of the injury response after laparoscopic cholecystectomy. *World J Surg* 1996; 20(5):528-33; discussion 533-4.
200. Mokart D, Capo C, Blache JL, et al. Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br J Surg* 2002; 89(11):1450-6.

201. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, et al. Increased plasma levels of IL-6 and IL-8 are associated with surgical site infection after pancreaticoduodenectomy. *Pancreas* 2006; 32(2):178-85.
202. Kraghsbjerg P, Holmberg H, Vikerfors T. Serum concentrations of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha, and C-reactive protein in patients undergoing major operations. *Eur J Surg* 1995; 161(1):17-22.
203. Szczepanik AM, Scislo L, Scully T, et al. IL-6 serum levels predict postoperative morbidity in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*; 14(3):266-73.
204. MacKay GJ, Molloy RG, O'Dwyer PJ. C-reactive protein as a predictor of postoperative infective complications following elective colorectal resection. *Colorectal Dis*; 13(5):583-7.
205. Aguilar-Nascimento JE, Marra JG, Silhessarenko N, Fontes CJ. Efficacy of National Nosocomial Infection Surveillance score, acute-phase proteins, and interleukin-6 for predicting postoperative infections following major gastrointestinal surgery. *Sao Paulo Med J* 2007; 125(1):34-41.
206. Douraiswami B, Dilip PK, Harish BN, Jagdish M. C-reactive protein and interleukin-6 levels in the early detection of infection after open fractures. *J Orthop Surg (Hong Kong)*; 20(3):381-5.
207. Baker EA, El-Gaddal S, Williams L, Leaper DJ. Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: relationship with wound healing and outcome. *Wound Repair Regen* 2006; 14(5):566-72.
208. Bertram P, Junge K, Schachtrupp A, et al. Peritoneal release of TNFalpha and IL-6 after elective colorectal surgery and anastomotic leakage. *J Invest Surg* 2003; 16(2):65-9.
209. Wiik H, Karttunen R, Haukipuro K, Syrjala H. Maximal local and minimal systemic cytokine response to colorectal surgery: the influence of perioperative filgrastim. *Cytokine* 2001; 14(3):188-92.

210. Schein M, Wittmann DH, Holzheimer R, Condon RE. Hypothesis: compartmentalization of cytokines in intraabdominal infection. *Surgery* 1996; 119(6):694-700.
211. Fouda E, El Nakeeb A, Magdy A, et al. Early detection of anastomotic leakage after elective low anterior resection. *J Gastrointest Surg*; 15(1):137-44.
212. Yamamoto T, Umegae S, Matsumoto K, Saniabadi AR. Peritoneal cytokines as early markers of peritonitis following surgery for colorectal carcinoma: a prospective study. *Cytokine*; 53(2):239-42.
213. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, et al. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and the effect of tumor surgery. *Surgery* 2002; 131(5):548-55.
214. De Vita F, Orditura M, Lieto E, et al. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004; 100(2):270-8.
215. Toi M, Kondo S, Suzuki H, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* 1996; 77(6):1101-6.
216. Sato K, Tsuchiya N, Sasaki R, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(8):874-9.
217. Fuhrmann-Benzakein E, Ma MN, Rubbia-Brandt L, et al. Elevated levels of angiogenic cytokines in the plasma of cancer patients. *Int J Cancer* 2000; 85(1):40-5.
218. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, et al. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg* 2002; 236(1):37-42.

219. Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66(1):1-9.
220. Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol* 1995; 57(5):747-51.
221. Mohle R, Green D, Moore MA, et al. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(2):663-8.
222. Malamitsi-Puchner A, Tziotis J, Tsonou A, et al. Changes in serum levels of vascular endothelial growth factor in males and females throughout life. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 7(5):309-12.
223. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235(4787):442-7.
224. Salgado R, Vermeulen PB, Benoy I, et al. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 80(5-6):892-7.
225. Benoy I, Salgado R, Colpaert C, et al. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2002; 2(4):311-5.
226. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271(2):736-41.
227. Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001; 47(4):617-23.
228. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77(6):956-64.

-
229. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(4):395-404.
 230. Lee SW, Gleason NR, Southall JC, et al. A serum-soluble factor(s) stimulates tumor growth following laparotomy in a murine model. *Surg Endosc* 2000; 14(5):490-4.
 231. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86(3):417-23.
 232. Hendriks T, Bleichrodt RP, Lomme RM, et al. Peritoneal cytokines predict mortality after surgical treatment of secondary peritonitis in the rat. *J Am Coll Surg*; 211(2):263-70.
 233. Pera MN. Role of proinflammatory cytokines and VEGF in tumor growth after open and laparoscopic colectomy in mice. *Journal of American College of Surgeons* 2002; 195(S69).
 234. Wu FP, Hoekman K, Meijer S, Cuesta MA. VEGF and endostatin levels in wound fluid and plasma after breast surgery. *Angiogenesis* 2003; 6(4):255-7.
 235. Karayiannakis AJ, Zbar A, Polychronidis A, Simopoulos C. Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res* 2003; 35(6):492-6.
 236. Hornbrey E, Han C, Roberts A, et al. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; 9(12):4332-9.
 237. Whitworth MK, Sheen A, Rosa DD, et al. Impact of laparotomy and liver resection on the peritoneal concentrations of fibroblast growth factor 2, vascular

- endothelial growth factor and hepatocyte growth factor. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132(1):41-4.
238. Baker EA, Kumar S, Melling AC, et al. Temporal and quantitative profiles of growth factors and metalloproteinases in acute wound fluid after mastectomy. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):95-101.
239. Akyol AM, McGregor JR, Galloway DJ, et al. Anastomotic leaks in colorectal cancer surgery: a risk factor for recurrence? *Int J Colorectal Dis* 1991; 6(4):179-83.
240. Fujita S, Teramoto T, Watanabe M, et al. Anastomotic leakage after colorectal cancer surgery: a risk factor for recurrence and poor prognosis. *Jpn J Clin Oncol* 1993; 23(5):299-302.
241. Khoury W, Lavery IC, Kiran RP. Impact of early reoperation after resection for colorectal cancer on long-term oncological outcomes. *Colorectal Dis*; 14(3):e117-23.
242. Bertelsen CA, Andreasen AH, Jorgensen T, Harling H. Anastomotic leakage after curative anterior resection for rectal cancer: short and long-term outcome. *Colorectal Dis*; 12(7 Online):e76-81.
243. McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ. Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92(9):1150-4.
244. Branagan G, Finnis D. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2005; 48(5):1021-6.
245. Petersen S, Freitag M, Hellmich G, Ludwig K. Anastomotic leakage: impact on local recurrence and survival in surgery of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1998; 13(4):160-3.

246. Bell SW, Walker KG, Rickard MJ, et al. Anastomotic leakage after curative anterior resection results in a higher prevalence of local recurrence. *Br J Surg* 2003; 90(10):1261-6.
247. Docherty JG, McGregor JR, Akyol AM, et al. Comparison of manually constructed and stapled anastomoses in colorectal surgery. West of Scotland and Highland Anastomosis Study Group. *Ann Surg* 1995; 221(2):176-84.
248. Chang SC, Lin JK, Yang SH, et al. Long-term outcome of anastomosis leakage after curative resection for mid and low rectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(54):1898-902.
249. Eberhardt JM, Kiran RP, Lavery IC. The impact of anastomotic leak and intra-abdominal abscess on cancer-related outcomes after resection for colorectal cancer: a case control study. *Dis Colon Rectum* 2009; 52(3):380-6.
250. Jorgren F, Johansson R, Damber L, Lindmark G. Anastomotic leakage after surgery for rectal cancer: a risk factor for local recurrence, distant metastasis and reduced cancer-specific survival? *Colorectal Dis*; 13(3):272-83.
251. den Dulk M, Marijnen CA, Collette L, et al. Multicentre analysis of oncological and survival outcomes following anastomotic leakage after rectal cancer surgery. *Br J Surg* 2009; 96(9):1066-75.
252. Takeuchi H, Saikawa Y, Oyama T, et al. Factors influencing the long-term survival in patients with esophageal cancer who underwent esophagectomy after chemoradiotherapy. *World J Surg*; 34(2):277-84.
253. Teucher G, Schindler AE. [Postoperative fever and prognosis in breast cancer]. *Arch Geschwulstforsch* 1987; 57(4):309-17.
254. Laurent C, Sa Cunha A, Couderc P, et al. Influence of postoperative morbidity on long-term survival following liver resection for colorectal metastases. *Br J Surg* 2003; 90(9):1131-6.

255. Schiesser M, Chen JW, Maddern GJ, Padbury RT. Perioperative morbidity affects long-term survival in patients following liver resection for colorectal metastases. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(6):1054-60.
256. Hsu YN, Liu CJ, Lin JK, et al. Liver abscess after liver metastasectomy is a poor prognostic factor in patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Surg*; 15(10):1798-806.
257. Nagasako Y, Satoh S, Isogaki J, et al. Impact of anastomotic complications on outcome after laparoscopic gastrectomy for early gastric cancer. *Br J Surg*; 99(6):849-54.
258. Katoh H, Yamashita K, Wang G, et al. Anastomotic leakage contributes to the risk for systemic recurrence in stage II colorectal cancer. *J Gastrointest Surg*; 15(1):120-9.
259. Lejeune FJ. Is surgical trauma prometastatic? *Anticancer Res*; 32(3):947-51.
260. Gutt CN, Riemer V, Kim ZG, et al. Impact of laparoscopic colonic resection on tumour growth and spread in an experimental model. *Br J Surg* 1999; 86(9):1180-4.
261. Shiromizu A, Suematsu T, Yamaguchi K, et al. Effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of lung metastasis in a murine model. *Surgery* 2000; 128(5):799-805.
262. van den Tol PM, van Rossen EE, van Eijck CH, et al. Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells. *Ann Surg* 1998; 227(2):242-8.
263. Miki C, Hiro J, Ojima E, et al. Perioperative allogeneic blood transfusion, the related cytokine response and long-term survival after potentially curative resection of colorectal cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2006; 18(1):60-6.
264. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357(9255):539-45.

265. Nielsen HJ, Christensen IJ, Sorensen S, et al. Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(8):617-23.
266. Nozoe T, Matsumata T, Sugimachi K. Preoperative elevation of serum C-reactive protein is related to impaired immunity in patients with colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2000; 23(3):263-6.
267. Oka M, Hirazawa K, Yamamoto K, et al. Induction of Fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann Surg* 1996; 223(4):434-40.
268. Eilber FR, Morton DL. Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer* 1970; 25(2):362-7.
269. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 2009; 15(2):425-30.
270. Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle* 2009; 8(20):3267-73.
271. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203):436-44.
272. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441(7092):431-6.
273. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917):860-7.
274. Miki C, Konishi N, Ojima E, et al. C-reactive protein as a prognostic variable that reflects uncontrolled up-regulation of the IL-1-IL-6 network system in colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci* 2004; 49(6):970-6.
275. Mynster T, Christensen IJ, Moesgaard F, Nielsen HJ. Effects of the combination of blood transfusion and postoperative infectious complications on prognosis

- after surgery for colorectal cancer. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Br J Surg* 2000; 87(11):1553-62.
276. Murphy A, Holcombe C. Effects of early discharge following breast surgery. *Prof Nurse* 2001; 16(5):1087-90.
277. Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, et al. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009; 27(21):3437-44.
278. Cole SW. Chronic inflammation and breast cancer recurrence. *J Clin Oncol* 2009; 27(21):3418-9.
279. Richards CH, Platt JJ, Anderson JH, et al. The impact of perioperative risk, tumor pathology and surgical complications on disease recurrence following potentially curative resection of colorectal cancer. *Ann Surg*; 254(1):83-9.
280. Wigmore SJ, McMahon AJ, Sturgeon CM, Fearon KC. Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88(2):255-60.
281. Werther K, Sorensen S, Christensen IJ, Nielsen HJ. Circulating vascular endothelial growth factor six months after primary surgery as a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Acta Oncol* 2003; 42(8):837-45.
282. Bessa X, Castells A, Lacy AM, et al. Laparoscopic-assisted vs. open colectomy for colorectal cancer: influence on neoplastic cell mobilization. *J Gastrointest Surg* 2001; 5(1):66-73.
283. Umpleby HC, Fermor B, Symes MO, Williamson RC. Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg* 1984; 71(9):659-63.
284. Goss P, Allan AL, Rodenhiser DI, et al. New clinical and experimental approaches for studying tumor dormancy: does tumor dormancy offer a therapeutic target? *Apmis* 2008; 116(7-8):552-68.

285. Belizon A, Balik E, Horst P, et al. Persistent elevation of plasma vascular endothelial growth factor levels during the first month after minimally invasive colorectal resection. *Surg Endosc* 2008; 22(2):287-97.
286. Brivio F, Lissoni P, Perego MS, et al. Abrogation of surgery-induced IL-6 hypersecretion by presurgical immunotherapy with IL-2 and its importance in the prevention of postoperative complications. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15(4):370-4.
287. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol*; 29(1):11-6.
288. Zhang Q, Haleem R, Cai X, Wang Z. Identification and characterization of a novel testosterone-regulated prominin-like gene in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 2002; 143(12):4788-96.
289. Liu W, Yan M, Liu Y, et al. Olfactomedin 4 down-regulates innate immunity against *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107(24):11056-61.
290. Kulkarni NH, Karavanich CA, Atchley WR, Anholt RR. Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. *Genet Res* 2000; 76(1):41-50.
291. Liu RH, Yang MH, Xiang H, et al. Depletion of OLFM4 gene inhibits cell growth and increases sensitization to hydrogen peroxide and tumor necrosis factor- α induced-apoptosis in gastric cancer cells. *J Biomed Sci*; 19:38.
292. Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, et al. Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci* 2007; 98(3):334-40.

-
293. Liu W, Liu Y, Zhu J, et al. Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(4):1041-9.
 294. Koshida S, Kobayashi D, Moriai R, et al. Specific overexpression of OLFM4(GW112/HGC-1) mRNA in colon, breast and lung cancer tissues detected using quantitative analysis. *Cancer Sci* 2007; 98(3):315-20.
 295. Zhang X, Huang Q, Yang Z, et al. GW112, a novel antiapoptotic protein that promotes tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64(7):2474-81.
 296. Chen L, Li H, Liu W, et al. Olfactomedin 4 suppresses prostate cancer cell growth and metastasis via negative interaction with cathepsin D and SDF-1. *Carcinogenesis*; 32(7):986-94.
 297. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*; 141(1):52-67.
 298. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3):161-74.
 299. Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, et al. Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer* 1995; 76(4):700-8.
 300. Holten-Andersen MN, Stephens RW, Nielsen HJ, et al. High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(11):4292-9.
 301. Vayrynen JP, Vornanen J, Tervahartiala T, et al. Serum MMP-8 levels increase in colorectal cancer and correlate with disease course and inflammatory properties of primary tumors. *Int J Cancer*; 131(4):E463-74.
 302. Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39(17):2499-505.

303. Balbin M, Fueyo A, Tester AM, et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 2003; 35(3):252-7.
304. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, et al. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem* 2007; 282(32):23603-12.
305. Suzuki M, Takaishi S, Nagasaki M, et al. Medium-chain fatty acid sensing receptor, GPR84 is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem*.
306. Ogami K, Yamaguchi R, Imoto S, et al. Computational gene network analysis reveals TNF-induced angiogenesis. *BMC Syst Biol*; 6 Suppl 2:S12.
307. Garcia V, Garcia JM, Pena C, et al. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. *Cancer Lett* 2008; 263(2):312-20.