

Respuesta inflamatoria postoperatoria, angiogénesis y crecimiento tumoral: estudio comparativo entre cirugía abierta y laparoscópica en un modelo animal de cáncer de colon

Miguel Pera^a, Heidi Nelson^b, Marta Pascual^a, Vincent Rajkumar^c, Tonia M. Young-Fadok^b, Lawrence J. Burgart^d y Luis Grande^a

^aUnidad de Cirugía Colorrectal. Servicio de Cirugía. Hospital del Mar. IMAS. Barcelona. España. ^bDivision of Colon and Rectal Surgery. Mayo Clinic Rochester. Minnesota. ^cDivision of Hematology and Internal Medicine. Mayo Clinic Rochester. Minnesota. ^dDepartment of Pathology. Mayo Clinic Rochester. Minnesota. Estados Unidos.

Resumen

Introducción. El crecimiento tumoral es mayor después de la cirugía abierta que tras la laparoscopia en estudios experimentales. La interleucina (IL) 6 y la IL-1 β son citocinas proinflamatorias cuya expresión aumenta más después de una laparotomía que tras una laparoscopia. *In vitro*, la IL-6 y la IL-1 β estimulan la expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular y la ciclooxigenasa-2. Hipótesis: el marcado aumento de citocinas proinflamatorias tras cirugía abierta estimula en mayor medida la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Métodos. Inducimos un tumor sólido en ratones mediante inyección de 5×10^6 células en la pared cecal. Los ratones fueron aleatorizados en resección cecal abierta y resección por laparoscopia. La IL-6, la IL-1 β y el factor de crecimiento del endotelio vascular se determinaron en suero durante el postoperatorio. Los animales se sacrificaron 12 días después. Se aplicó una puntuación a la recidiva tumoral en fun-

ción de su extensión y se determinó el peso total del tumor. La densidad microvascular y la expresión de la ciclooxigenasa-2 se estudiaron mediante inmunohistoquímica.

Resultados. La puntuación y el peso del tumor fueron mayores en el grupo de resección cecal abierta ($p < 0,01$). Los valores séricos de IL-6 (4.157 ± 1.297 frente a 2.514 ± 1.417 pg/ml, en los grupos de resección cecal abierta y resección por laparoscopia, respectivamente) y factor de crecimiento del endotelio vascular (231 ± 125 frente a 45 ± 9 pg/ml, en los grupos de resección cecal abierta y resección por laparoscopia, respectivamente) fueron mayores en el grupo de resección cecal abierta ($p < 0,01$). La angiogénesis estaba aumentada en el grupo de resección cecal abierta. La densidad microvascular media \pm desviación estándar fue de $34,3 \pm 11,5$ en el grupo de resección cecal abierta frente a $15,5 \pm 12,5$ en el de resección por laparoscopia ($p < 0,01$). La expresión de ciclooxigenasa-2 también era mayor en el grupo de resección cecal abierta. Los valores séricos de IL-6 se correlacionaron con los del factor de crecimiento del endotelio vascular ($\rho = 0,61$; $p < 0,001$). A su vez, los valores de factor de crecimiento del endotelio vascular se correlacionaron con la densidad microvascular y con el peso tumoral ($\rho = 0,63$; $p < 0,001$).

Conclusiones. El aumento de citocinas proinflamatorias tras la cirugía abierta se asocia con una mayor angiogénesis y un mayor crecimiento tumoral, en comparación con la cirugía laparoscópica en ratones.

Palabras clave: Laparoscopia. Angiogénesis. Cáncer de colon. IL-6. IL-1 β . VEGF. Cox-2.

Este trabajo ha sido subvencionado, en parte, con una beca para *Fellows* Internacionales de la American Society of Colon and Rectal Surgeons (Dr. Pera) y con una Beca posdoctoral (EX2001-35105008) del Ministerio de Educación y Cultura de España (Dr. Pera).

Correspondencia: Dr. Miguel Pera.
Unidad de Cirugía Colorrectal. Servicio de Cirugía General.
Hospital del Mar.
Pg. Marítim, 25-29. 08003 Barcelona. España.
Correo electrónico: mpera@imas.imim.es

Manuscrito recibido el 9-1-2004 y aceptado el 20-2-2004.

INFLUENCE OF POSTOPERATIVE ACUTE-PHASE RESPONSE ON ANGIOGENESIS AND TUMOR GROWTH: OPEN *VERSUS* LAPAROSCOPIC-ASSISTED SURGERY IN AN ANIMAL MODEL OF COLON CANCER

Introduction. Inflammatory response and tumor growth are increased after laparotomy compared with laparoscopy in some animal models. *In vitro*, the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and IL-1 β up-regulate the expression of angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The aim of this study was to investigate the influence of postoperative inflammatory response on angiogenesis and tumor growth.

Methods. Solid tumor induction was achieved through injection of 5×10^6 B51LiM cells into the cecal wall of Balb/c mice. The animals were randomized into two groups: open cecectomy (OC) and laparoscopic-assisted cecectomy (LC). Serum IL-6, IL-1 β and VEGF levels were determined postoperatively. On postoperative day 12, the mice were sacrificed. Tumor load score and weight were calculated. Immunohistochemistry for CD31 and COX-2 was performed on samples of tumor recurrence.

Results. Tumor load score and weight were significantly greater after laparotomy than after laparoscopy ($p < 0.01$). Serum IL-6 (OC: 4157 ± 1.297 pg/ml *versus* LC: 2.514 ± 1.417 pg/ml) and VEGF levels (OC: 231 ± 125 pg/ml *vs.* LC: 45 ± 9 pg/ml) were significantly higher in the laparotomy group ($p < 0.01$). Microvessel density (mean \pm SD) was 34.3 ± 11.5 in the OC group *versus* 15.5 ± 12.5 in the LC group ($p < 0.01$). COX-2 expression was also significantly higher in the OC group. A positive correlation was found between postoperative serum levels of IL-6 and VEGF ($\rho = 0.67$; $p < 0.001$). VEGF levels were also correlated with microvessel density and tumor weight ($\rho = 0.63$, $p < 0.001$).

Conclusions. Increased systemic levels of proinflammatory cytokines are associated with greater angiogenesis and tumor growth after laparotomy than after laparoscopy in mice.

Key words: Laparoscopy. Angiogenesis. Colon cancer. IL-6. IL-1 β . VEGF. COX-2.

Introducción

En varios estudios experimentales se ha demostrado que el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis se aceleran más después de una laparotomía en comparación con una laparoscopia¹⁻⁴. Además, en un reciente estudio clínico aleatorizado se observó que los pacientes con cáncer de colon en estadio III, a quienes se había practicado la resección por laparoscopia, presentaban menos recurrencias y una mayor supervivencia en comparación con aquellos intervenidos mediante cirugía abierta⁵. Sin embargo, los mecanismos causales de estas diferencias se desconocen.

Uno de los componentes esenciales para la recurrencia tumoral y el desarrollo de metástasis es la angiogénesis, que consiste en la formación de nuevos vasos a partir de vasos ya existentes, en cuya ausencia, los tumores⁶ no pueden alcanzar un diámetro superior a 2 mm. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una de las citocinas angiogénicas más potentes que se conocen. No sólo estimula la proliferación de células endoteliales, sino que también aumenta la permeabilidad vascular, por lo que facilita la diseminación hematológica de las células tumorales. En pacientes con cáncer de colon, el aumento de la angiogénesis tumoral, así como los valores séricos elevados de VEGF se asocian con un período libre de enfermedad más corto y con una menor supervivencia⁷. La expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) también se ha implicado recientemente en la regulación de factores angiogénicos en el cáncer de colon. Se ha observado *in vitro* un aumento de angiogénesis y de las citocinas proangiogénicas, como el VEGF o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, en las células tumorales CaCo-2 que sobreexpresan COX-2⁸. Asimismo, un estudio con muestras de cáncer de colon humano mostró una correlación significativa entre la expresión de VEGF y de COX-2 mediante inmunohistoquímica⁹. Los tumores con una mayor expresión de COX-2 han mostrado también una mayor densidad microvascular (DMV).

Por otra parte, la interleucina (IL) 6 y la IL-1 β son citocinas proinflamatorias producidas por diferentes tipos celulares¹⁰. Los valores séricos de IL-6 e IL-1 β son marcadores tempranos y muy sensibles del daño tisular porque se elevan en proporción con el grado de traumatismo quirúrgico^{10,11}. Dado que la agresión quirúrgica es menos intensa tras la cirugía laparoscópica que después de la cirugía abierta, la respuesta inflamatoria y la activación de citocinas son también menos importantes¹²⁻¹⁴. Recientes estudios *in vitro*, con diferentes líneas celulares de carcinoma, han demostrado que la IL-6 y la IL-1 β estimulan la expresión de VEGF¹⁵. Asimismo, se ha observado, en células humanas de cáncer de colon, que el aumento de la expresión de IL-6 e IL-1 β se asocia con una mayor expresión de la COX-2¹⁶.

La hipótesis de este estudio propone que las diferencias de crecimiento tumoral observadas entre cirugía abierta y laparoscópica se deben a diferencias en la intensidad de la respuesta inflamatoria y de la angiogénesis durante el período postoperatorio.

Material y métodos

Animales

Se han utilizado 47 ratones Balb/c (Laboratorios Charles River, Wilmington, Estados Unidos) de entre 6 y 8 semanas de edad, y con un peso de entre 19 y 21 g. Todos los procedimientos descritos fueron revisados y aprobados por el Comité de Cuidados y Manipulación de Animales (IACUC) de la Clínica Mayo, Rochester, Estados Unidos.

Línea celular tumoral

Hemos utilizado una línea celular de adenocarcinoma de colon (51BLiM) proporcionada por el Dr. Bresalier, del Henry Ford Health

Sciences Center, Detroit, Estados Unidos. La línea 51BLiM es singénica con la cepa de ratón Balb/c. Los cultivos celulares se mantuvieron con el medio RPMI 1.640 complementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina y estreptomina a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La viabilidad de las células utilizadas siempre fue superior al 95%.

Inducción de un tumor sólido en el colon

Hemos empleado el modelo de tumor sólido en el ciego descrito por Bresalier et al¹⁷. Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina y xilacina (100/10 mg/kg). Se practicó, a continuación, una incisión de 5 mm en la línea media y se inyectaron 5×10^6 células en la pared cecal en 0,1 ml de medio de cultivo. A continuación, se reintrodujo el ciego en la cavidad abdominal y se cerró la pared con puntos sueltos de Vicryl 3-0.

Grupos de estudio y técnica quirúrgica

Dos semanas después de la inyección cecal los ratones fueron aleatorizados en 2 grupos: resección del ciego mediante una laparotomía (CA) y resección cecal asistida por laparoscopia (CL). En un estudio piloto realizado previamente habíamos comprobado que después de 2 semanas en el 85% de los animales aparece un tumor en el ciego, de unos 5 mm de diámetro, sin diseminación peritoneal ni metástasis hepáticas. En los ratones del grupo CA, se practicó una incisión de 35 mm en la línea media, se disecaron las adherencias existentes y el ciego fue exteriorizado y resecado tras colocar una ligadura de seda 3-0 en su base. En todos los casos quedó un pequeño muñón cecal junto a la unión ileocecal. Durante la intervención se manipuló el intestino delgado, pero no el ciego. La herida se protegió con gasas estériles empapadas en povidona yodada. La laparotomía se cerró con una sutura continua de Vicryl 3-0. La duración de la intervención fue de 40 min en todos los animales.

En los ratones del grupo CL, se practicó una incisión transversa de 5 mm en el vacío izquierdo a través de la que se introdujo un trocar de 5 mm (Ethicon Endo-Surgery, Inc.) por el que se insufló CO₂ hasta una presión máxima de 4 mmHg. Se colocaron otros 2 trócares en el área subxifoidea y en el vacío derecho (angiocatéteres de 16 y 14 G, respectivamente). A continuación, se introdujo una óptica de 5 mm (Stryker Corp., Postage, Estados Unidos) a través del trocar del vacío izquierdo y se procedió a inspeccionar el abdomen para descartar la presencia de metástasis. El neumoperitoneo se mantuvo en todos los animales durante 30 min. Al igual que en el grupo CA, se manipuló el intestino delgado y no el tumor durante la intervención. Después de vaciar el gas a través de los trócares, el ciego se exteriorizó por la incisión del vacío izquierdo, que se extendió en caso necesario. El ciego fue resecado tal y como se ha descrito previamente. Las heridas se cerraron con puntos sueltos de Vicryl 3-0. El tiempo operatorio total fue de 40 min.

Todas las piezas de resección quirúrgica se inspeccionaron para confirmar la presencia o ausencia de tumor. Los animales en los que no se observaba macroscópicamente una tumoración cecal se eliminaron del estudio. Se procedió, además, a medir el diámetro máximo del tumor y a pesar el ciego. Los animales con enfermedad metastásica en el momento de la cecectomía también fueron eliminados del estudio.

Muestras de sangre y estudio de los valores séricos de citocinas

Se obtuvieron 0,3 ml de sangre venosa del plexo retroorbitario bajo anestesia con metoxifluorano antes de la inyección cecal, a las 6, 24 y 48 h, y a los 5 días después de la cecectomía; también en el momento del sacrificio. Las muestras de suero, obtenidas tras centrifugación, se congelaron a -80 °C para estudio posterior de los valores de las citocinas proinflamatorias IL-6 (Opteia mouse IL-6 kit; BD Pharmingen, San Diego, Estados Unidos) e IL-1 β y de VEGF (Quantikine mouse IL-1 β y VEGF kits; R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos).

Evaluación macroscópica y obtención de muestras de tejidos

Los animales se sacrificaron 12 días después de la resección cecal. Un observador, que desconocía a qué grupo pertenecía cada animal, valoró el crecimiento tumoral en la pared abdominal, el muñón cecal, el peritoneo parietal, el mesenterio, el epiplón, el retroperitoneo, el hígado y el riñón. En cada una de las localizaciones anteriores se aplicó el siguiente sistema de puntuación modificado²: 0 = ausencia de tumor; 1 = diámetro inferior a 0,5 cm; 2 = diámetro entre 0,5 y 1 cm; 3 = diámetro entre 1 y 1,5 cm; 4 = diámetro entre 1,5 y 2 cm; 5 = diámetro mayor de 2 cm. Se calculó la puntuación total sumando las puntuaciones obtenidas en cada una de las distintas localizaciones (puntuación tumoral total). Además, se determinó el peso de todo el tumor presente en la cavidad abdominal (peso tumoral total).

Se obtuvieron muestras del muñón cecal y del peritoneo parietal, que se fijaron con cinc, y se procesaron e incluyeron en parafina para estudio histológico. Se obtuvieron cortes de 4 μ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Inmunohistoquímica

La angiogénesis se valoró utilizando técnicas inmunohistoquímicas habituales para la identificación de microvasos tumorales. Las preparaciones de tejido se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos frente al antígeno CD31 (Pharmingen) a una dilución de 1:30. Asimismo, se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a la proteína COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) a una dilución de 1:1.500. Se utilizaron muestras procesadas sin el anticuerpo primario como controles negativos.

Cálculo de la densidad microvascular y evaluación de la expresión de COX-2

Todas las valoraciones fueron realizadas por un patólogo que desconocía a qué grupo pertenecía cada preparación. Para el cálculo de la DMV, cada preparación fue examinada a una magnificación de $\times 100$ con el fin de determinar 3 áreas en las que se concentran un mayor número de vasos, lo que se conoce como puntos calientes o *hot spots*. Los microvasos fueron entonces contados en cada una de las 3 áreas a una magnificación de $\times 400$. La DMV se calculó determinando la media del número de vasos en las 3 áreas.

Para valorar la distribución y la intensidad de la inmunorreactividad frente a la COX-2 utilizamos un sistema de puntuación semicuantitativo validado previamente¹⁶. La distribución se valoró asignando una puntuación de acuerdo con el número de células positivas: ninguna (no teñidas), 0; focal (menos de un tercio de las células teñidas), 1; multifocal (menos de 2 tercios de las células teñidas), 2; y difuso (mayoría de células teñidas), 3. La intensidad de la tinción fue valorada de la siguiente forma: negativa, 0; moderada, 1; positiva, 2. Las 2 puntuaciones, distribución e intensidad, fueron sumadas dando cada uno de los siguientes grados de tinción: 0, negativo; 2, intermedio, y 3, 4 y 5, positivo.

Análisis estadístico

Con 10 animales en cada uno de los 2 grupos de tratamiento debería haber por lo menos un 80% de posibilidades (poder estadístico) de detectar una diferencia en la respuesta media que es mayor o igual a 1,4 desviaciones estándar de las mediciones individuales. Por ejemplo, si la desviación estándar del VEGF es 10 pg/ml¹⁸, entonces el poder estadístico para detectar una diferencia en el VEGF medio mayor o igual que (1,4 \times 10) 14 pg/ml sería del 80%.

Según los resultados de un estudio piloto, calculamos que aproximadamente un 20% de los animales sería excluido en el momento de la cecectomía, por la ausencia de tumor macroscópicamente visible o por la presencia de enfermedad metastásica. Además, anticipamos un porcentaje de mortalidad perioperatoria cercano al 20% según estudios previos de resección asistida por laparoscopia de tumores sólidos¹⁹.

Así, el número de ratones incluidos en el estudio fue aumentado con el fin de disponer de 10 animales como mínimo en cada grupo para el análisis final.

Las variables cualitativas se compararon entre los 2 grupos mediante el test de la χ^2 . Las variables cuantitativas fueron comparadas entre los 2 grupos mediante el test de Mann-Whitney dada la distribución no paramétrica de las variables en este estudio. Una $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Para calcular el grado de asociación entre las variables, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los cálculos se llevaron a cabo con JMP, SAS Institute (versión 4.0.4).

Resultados

Hallazgos operatorios y mortalidad postoperatoria

Cuatro de los 47 ratones utilizados en el estudio murieron durante las 48 h siguientes a la inyección cecal por isquemia del ciego. Los 43 ratones restantes se aleatorizaron en los 2 grupos del estudio: 23 ratones fueron asignados al grupo CA y 20 al grupo CL. Se excluyeron 8 ratones (18%) después de la aleatorización. En 6 casos, 3 en cada grupo, no se encontró tumor en el ciego en el momento de la resección, y en 2 animales, 1 en cada grupo, se encontraron implantes peritoneales. Los restantes 35 ratones fueron intervenidos tal y como se ha descrito en la sección de "Material y métodos".

La longitud de la laparotomía media en todos los ratones del grupo CA fue de 35 mm frente a $6,9 \pm 1,8$ mm en el grupo CL. No encontramos diferencias en el tamaño medio ($4,5 \pm 2$ frente a $4,4 \pm 1,5$ mm, en los grupos CA y CL, respectivamente) ni en el peso medio ($43,4 \pm 33,3$ $47,2 \pm 20,9$ mg, en los grupos CA y CL, respectivamente) de los tumores de los 2 grupos (fig. 1).

No observamos diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad intraoperatoria y postoperatoria entre los 2 grupos (el 21 frente al 25%, en los grupos CA y CL, respectivamente). La principal causa de muerte fue la insuficiencia respiratoria durante la operación, seguida de la peritonitis secundaria a perforación intestinal. En to-

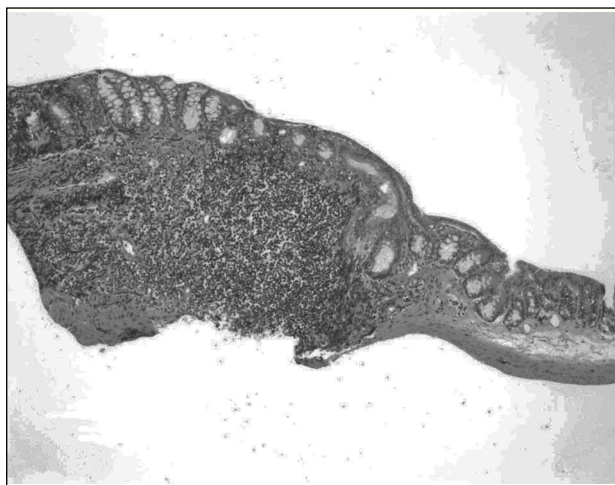


Fig. 1. Imagen microscópica ($\times 10$) de uno de los tumores de ciego del grupo CA con una diámetro máximo de 4 mm. Se aprecia infiltración y rotura de la capa serosa.

tal, 27 animales sobrevivieron hasta el día 12 tras la operación, cuando fueron sacrificados: 15 ratones en el grupo CA y 12 en el grupo CL.

Recurrencia tumoral

No encontramos diferencias en la incidencia de recurrencia tumoral entre los 2 grupos (el 80 frente al 77%, en los grupos CA y CL, respectivamente). Sin embargo, la puntuación tumoral total y el peso tumoral total fueron significativamente mayores en el grupo CA en comparación con el grupo de laparoscopia (fig. 2). La localización más frecuente de la recurrencia en los 2 grupos fue el muñón cecal seguida de la herida de la laparotomía media y el peritoneo. Sólo 1 de los 12 ratones del grupo CL presentó una metástasis en uno de los orificios de los trócares. En 3 de los ratones del grupo CA (20%) se encontraron metástasis hepáticas, mientras que esto no ocurrió en ninguno de los ratones del grupo CL ($p < 0,05$). Las metástasis del grupo CA eran intraparenquimatosas en 2 ratones, mientras que en el tercer caso se encontraban en la superficie.

Densidad microvascular intratumoral y expresión de COX-2

La angiogénesis estaba aumentada significativamente en el grupo de cirugía abierta. La DMV media en el grupo CA fue de $34,3 \pm 11,5$ vasos por campo comparada con $15,5 \pm 12,5$ en el grupo CL ($p < 0,01$). Las células tumorales y el endotelio que las rodea mostraron expresión de COX-2 mediante inmunohistoquímica en los 2 grupos. Sin embargo, el grado de la tinción fue significativamente mayor en el grupo CA en comparación con el grupo CL ($4,3 \pm 1,2$ frente a $2,1 \pm 0,9$; $p < 0,05$).

Valores séricos de IL-6, IL-1 β y VEGF

Los valores séricos de IL-6 alcanzaron un pico máximo 6 h después de la intervención quirúrgica en los 2 grupos. Cuando comparamos los valores de IL-6 entre los 2 grupos, observamos que fueron significativamente más elevados en el grupo de cirugía abierta (fig. 3a). Asimismo, los valores séricos de IL-1 β 24 h después de la resección también fueron significativamente más elevados en el grupo CA (fig. 3b). Los valores séricos de VEGF 12 días después de la operación también estaban más elevados de forma significativa en el grupo CA (fig. 4).

Encontramos una correlación positiva entre los valores séricos de IL-6 a las 6 h de la intervención y los valores pico de VEGF ($\rho = 0,67$; $p < 0,001$). No observamos correlación entre los valores pico de IL-1 β y de VEGF ($\rho = 0,15$; $p = 0,7$). Finalmente, encontramos una correlación positiva entre los valores séricos pico de VEGF y el peso tumoral, así como con la puntuación tumoral total ($\rho = 0,6$; $p < 0,001$). Los valores séricos de VEGF también se correlacionaron con la DMV ($\rho = 0,55$; $p < 0,01$).

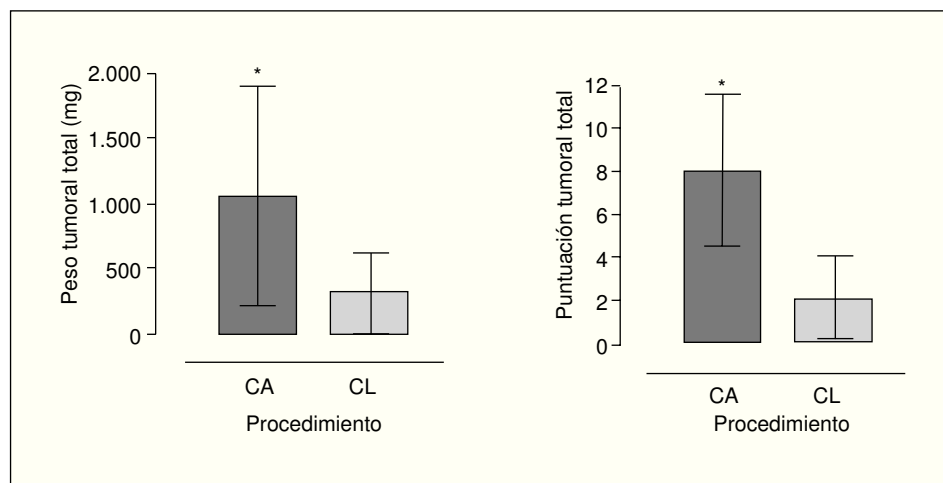


Fig. 2. Peso tumoral total y puntuación tumoral total en cada uno de los 2 grupos del estudio. * $p < 0,05$.

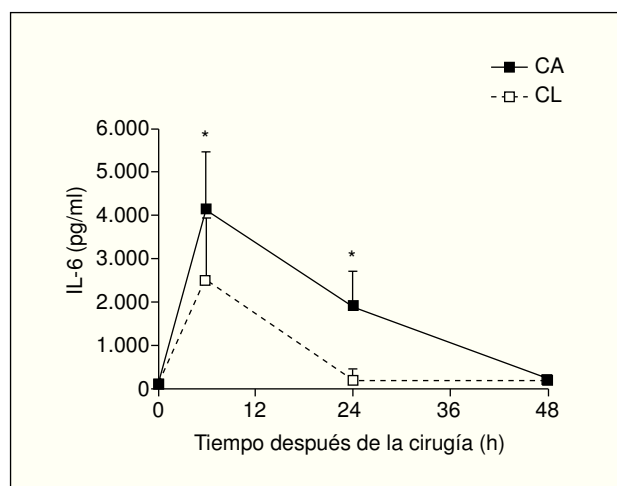


Fig. 3a. Valores séricos de interleucina (IL) 6 durante el postoperatorio inmediato en cada uno de los 2 grupos del estudio. * $p < 0,01$.

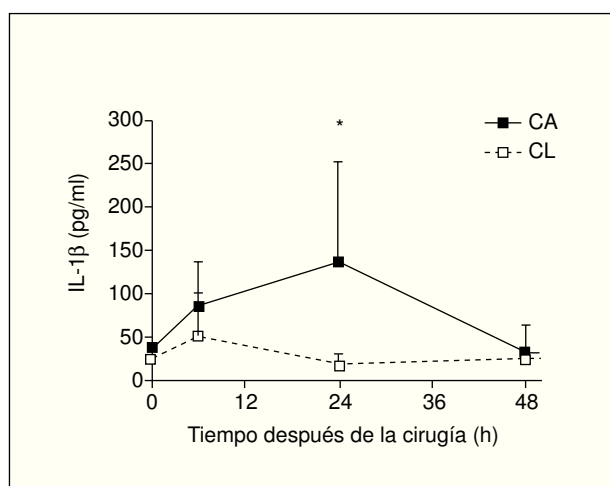


Fig. 3b. Valores séricos de interleucina (IL) 1β en cada uno de los 2 grupos del estudio. Se observan diferencias estadísticamente significativas a las 24 h después de la cirugía. * $p < 0,05$.

Discusión

Los resultados de los estudios aleatorizados multicéntricos actualmente en curso son los que permitirán conocer finalmente la influencia del abordaje quirúrgico sobre las metástasis en las heridas de la pared abdominal, la recurrencia y la supervivencia en pacientes con cáncer de colon^{20,21}. En los últimos años, se han realizado varios estudios experimentales en los que se ha investigado el efecto del neumoperitoneo sobre el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis en comparación con la laparotomía¹⁻⁴. De acuerdo con el resultado de otros modelos animales, el presente estudio ha demostrado que el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis están aumentados después de una laparotomía en comparación con la laparoscopia. Otros estudios, sin embargo, no han conseguido demostrar diferencias entre las 2 vías de abordaje^{22,23} o incluso han demostrado un mayor crecimiento tumoral asociado a la laparoscopia^{24,25}. Estos resultados contradictorios pue-

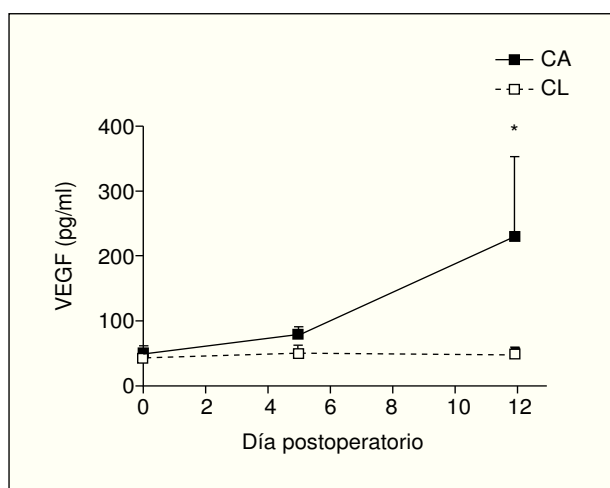


Fig. 4. Valores séricos de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) después de la cirugía en cada uno de los 2 grupos. * $p < 0,01$.

den explicarse por varias razones. En primer lugar, el uso de modelos de suspensión celular produce un número muy elevado de células intraperitoneales libres no comparable con la realidad y que puede eliminar o reducir diferencias entre procedimientos. En segundo lugar, la resección completa de tumores por vía laparoscópica en animales pequeños es técnicamente difícil y puede ser más traumática que la resección abierta y dar lugar a la diseminación de células tumorales en la cavidad peritoneal¹⁹. A pesar de la disparidad de resultados entre alguno de estos estudios, creemos que los modelos animales de tumores sólidos constituyen una buena herramienta para comprender las bases del crecimiento tumoral después de la cirugía.

De acuerdo con los resultados de otros estudios clínicos y experimentales, hemos observado que los valores séricos de IL-6 e IL-1 β no sólo fueron más altos sino que permanecieron elevados durante más tiempo después de cirugía abierta que después de cirugía laparoscópica^{4,12,14}. Estas citocinas proinflamatorias son los principales mediadores de la respuesta de fase aguda y están considerados como marcadores de la lesión tisular después de la cirugía^{10,11}. Por tanto, nuestros resultados confirman que la respuesta inflamatoria es mayor después de cirugía abierta que después de laparoscopia. Si la menor respuesta inflamatoria tras cirugía oncológica por laparoscopia se correlaciona con un menor crecimiento tumoral, es algo que no ha sido investigado hasta ahora.

Se ha sugerido que la respuesta inmunitaria está mejor preservada después de cirugía laparoscópica que después de cirugía abierta^{26,27}. En teoría, la mayor inmunosupresión después de una laparotomía podría facilitar el crecimiento tumoral y explicaría las diferencias observadas en algunos modelos animales. Sin embargo, los efectos beneficiosos de la laparoscopia sobre el sistema inmunitario no se han demostrado de forma consistente, especialmente cuando se ha investigado la inmunidad local intraperitoneal²⁸, por lo que deben estudiarse otros factores implicados en el crecimiento tumoral. En este sentido, los resultados del presente estudio demuestran que la angiogénesis, valorada mediante los valores séricos de VEGF y la DMV intratumoral, está aumentada después de la cirugía abierta en comparación con la laparoscopia.

La angiogénesis está regulada tanto por inductores como por inhibidores de la proliferación y migración de las células endoteliales, que son producidos por las células tumorales y por otras células dentro del microambiente que rodea el tumor. Cambios en el equilibrio entre inductores e inhibidores pueden activar el denominado interruptor angiogénico (*angiogenic switch*) mediante la estimulación de la formación de nuevos vasos que son esenciales para el crecimiento tumoral⁶. Uno de los factores proangiogénicos más potentes que conocemos es el VEGF, que estimula *in vitro* la proliferación y quimiotaxis de las células endoteliales⁶. En pacientes con cáncer colorrectal, los valores séricos elevados de VEGF y el aumento de la DMV intratumoral se correlacionan de forma significativa con un menor período libre de enfermedad⁷ y una menor supervivencia global²⁹. Por otra parte, la ciclooxigenasa, enzima responsable de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas,

presenta una forma inducible denominada COX-2 que sólo se expresa tras la estimulación por determinados factores de crecimiento, citocinas y mitógenos. Se ha observado un aumento de la expresión de la COX-2 por las células epiteliales de los tumores colorrectales³⁰ y, recientemente, se ha demostrado que esta enzima estimula la angiogénesis probablemente mediante la inducción de VEGF⁸.

Muchos factores diferentes pueden alterar el balance entre citocinas proangiogénicas y antiangiogénicas¹⁸. Se ha demostrado que la IL-6 y la IL-1 β estimulan la expresión del ARNm del VEGF en diferentes líneas celulares de carcinoma¹⁵. Otras evidencias apoyan el papel de la IL-6 en la angiogénesis y el crecimiento tumoral. En pacientes con cáncer avanzado de mama, ovario y colon, los valores séricos de IL-6 se correlacionan con los valores de VEGF³¹. En un estudio sobre 208 pacientes con cáncer de colon, la elevación preoperatoria de IL-6 en suero se asoció con un estadio tumoral avanzado y un mal pronóstico³². Asimismo, se ha observado recientemente que la expresión de IL-6 y la IL-1 β en células de cáncer de colon se asocia con una mayor expresión de COX-2¹⁶.

Los resultados de nuestro estudio han demostrado una correlación positiva significativa entre los valores séricos postoperatorios de IL-6 y VEGF y también entre los del VEGF, la DMV y el crecimiento tumoral, lo que sugiere que la expresión aumentada y continuada de citocinas proinflamatorias podría activar la formación de nuevos vasos durante el período postoperatorio. Se ha demostrado que la presencia de una respuesta de fase aguda 3 meses después de cirugía curativa por cáncer colorrectal se asocia con un mayor porcentaje de recurrencia tumoral³³. Mediante la estimulación de la angiogénesis, una respuesta inflamatoria aumentada puede proporcionar el microambiente en el que células tumorales viables residuales presentes dentro de la luz intestinal, en el lecho quirúrgico y en sangre venosa tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y desarrollar una recurrencia local o una metástasis a distancia.

Podría discutirse que el tiempo entre el valor pico de IL-6 a las 6 h de la intervención y el aumento de los valores séricos de VEGF a los 12 días de la resección no permite explicar una relación causal a pesar de la correlación positiva observada entre los niveles séricos de ambas citocinas. Sin embargo, este período prolongado podría explicarse por la intervención de otros mediadores en el aumento de la expresión de VEGF inducida por la IL-6, como la COX-2⁸. En este sentido, se ha demostrado *in vitro* que la IL-6 aumenta la expresión de COX-2 en células humanas tumorales³⁴. La observación mediante inmunohistoquímica de una mayor expresión de COX-2 en el grupo de cirugía abierta apoya esta hipótesis.

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran que los valores aumentados de citocinas proinflamatorias después de cirugía abierta se asocian con una mayor expresión de VEGF y una mayor angiogénesis en comparación con la cirugía laparoscópica, lo que podría explicar, al menos en parte, el mayor crecimiento tumoral observado después de una laparotomía comparado con la laparoscopia en algunos modelos experimentales.

Bibliografía

- Allendorf J, Bessler M, Kayton M, Oesterling S, Treat M, Nowygrod R, et al. Increased tumor establishment and growth after laparotomy versus laparoscopy in a murine model. *Arch Surg* 1995;130:649-53.
- Bouvy N, Marquet R, Jeekel J, Bonjer H. Laparoscopic surgery is associated with less tumor growth stimulation than conventional surgery: an experimental study. *Br J Surg* 1997;84:358-61.
- Da Costa M, Redmond H, Finnegan N, Flynn M, Bouchier-Hayes D. Laparotomy and laparoscopy differentially accelerate experimental flank tumor growth. *Br J Surg* 1998;85:1439-42.
- Shiromizu A, Suematsu T, Yamaguchi K, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of lung metastasis in a murine model. *Surgery* 2000;128:799-805.
- Lacy A, García-Valdecasas J, Delgado S, Castells A, Taurá P, Piqué J, et al. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 2002;359:2224-9.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
- Cascinu S, Staccioli M, Gasparini G, Giordani P, Catalano V, Ghiselli R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2803-7.
- Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-16.
- Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-47.
- Baigrie R, Lamont P, Kwiatkowski D, Dallman M, Morris P. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 1992;79:757-60.
- Cruickshank A, Fraser W, Burns H, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci* 1990;79:161-5.
- Harmon G, Senagore A, Kilbride M, Warzynski M. Interleukin-6 response to laparoscopic and open colectomy. *Dis Colon Rectum* 1994;754-9.
- Leung K, Lai P, Ho R, Meng W, Yiu R, Lee J, et al. Systemic cytokine response after laparoscopic-assisted resection of rectosigmoid carcinoma. A prospective randomized trial. *Ann Surg* 2000;231:506-11.
- Delgado S, Lacy A, Filella X, Castells A, García-Valdecasas J, Piqué J, et al. Acute-phase response in laparoscopic and open colectomy in colon cancer: randomized study. *Dis Colon Rectum* 2001;44:638-46.
- Cohen T, Nahari D, Cerem L, Neufeld G, Levi B. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-41.
- Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1 beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2003;24:665-71.
- Bresalier R, Hujanen E, Raper S, Roll J, Itzkowitz S, Martin G, et al. An animal model for colon cancer metastasis: establishment and characterization of murine cell lines with enhanced liver-metastasizing ability. *Cancer Res* 1987;47:1398-406.
- Pidgeon G, Harmey J, Kay E, Da Costa M, Redmond H, Bouchier-Hayes D. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br J Cancer* 1999;81:1311-7.
- Lee S, Whelan R, Southall J, Bessler M. Abdominal wound recurrence after open and laparoscopic-assisted splenectomy in a murine model. *Dis Colon Rectum* 1998;41:824-31.
- Fleshman J, Nelson H, Peters W, Kim H, Larach S, Boorse R, et al. Early results of laparoscopic surgery for colorectal cancer. Retrospective analysis of 372 patients treated by Clinical Outcomes of Surgical Therapy (COST) study group. *Dis Colon Rectum* 1996;39:S53-8.
- Group TCS. COLOR: a randomized trial comparing laparoscopic and open resection for colon cancer. *Dig Surg* 2000;17:617-22.
- Moreno E, Nelson H, Carugno F, Hodge D, Mozes G, Thompson G. Effects of laparoscopy on tumor growth. *Surg Laparosc Endosc* 2000;10:296-301.
- Fondrinier E, Boisdron-Celle M, Chassevent A, Lorimier G, Gamelin E. Experimental assessment of tumor growth and dissemination of a microscopic peritoneal carcinomatosis after CO₂ peritoneal insufflation or laparotomy. *Surg Endosc* 2001;15:843-8.
- Le Moine M, Navarro F, Burgel J, Pellegrin A, Khiari A, Pourquier D, et al. Experimental assessment of the risk of tumor recurrence after laparoscopic surgery. *Surgery* 1998;123:427-31.
- Dorrance H, Oien K, O'Dwyer P. Effects of laparoscopy on intraperitoneal tumor growth and distant metastases in an animal model. *Surgery* 1999;126:35-40.
- Allendorf J, Bessler M, Whelan R, Trokel M, Laird D, Terry M, et al. Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg Endosc* 1997;11:427-30.
- Allendorf J, Bessler M, Horvath K, Marvin M, Laird D, Whelan R. Increased tumor establishment and growth after open versus laparoscopic surgery in mice may be related to differences in postoperative T-cell function. *Surg Endosc* 1999;13:233-9.
- West M, Hackman D, Baker J, Rodríguez J, Bellingham J, Rotstein O. Mechanism of decreased *in vitro* murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide. Relevance to laparoscopic surgery. *Ann Surg* 1997;226:179-90.
- Vermeulen P, Van den Eynden G, Huget P, Goovaerts G, Weyler J, Lardon F, et al. Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;79:316-22.
- Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999;282:1254-7.
- Salgado R, Vermeulen P, Benoy I, Weytjens R, Huget P, Van Marck E, et al. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. *Br J Cancer* 1999;80:892-7.
- Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2000;7:133-8.
- McMillan D, Wotherspoon H, Fearon K, Sturgeon C, Cooke T, McArdle C. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 1995;170:319-22.
- Wang L, Chow K, Wu Y. Effects of platelet activating factor, butyrate and IL-6 on COX-2 expression in human esophageal cancer cells. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:467-75.