

- patients less than 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 343-5.
9. Delpero JR, LeTreut YP, Granger F, Pol B, Houvenaeghel G, Brandone JM. Chirurgie des récives locorégionales des cancers colorectaux. *Lyon Chir* 1992; 88 (6): 475-82.
 10. Pol B, Delpero JR, Le Terut YP, Hardwigsen J, Houvenaeghel G. Resections of colorrectal adenocarcinoma recurrentes: a series of 120 patients. *Br J Surg* 1996; 83 (2): 32-3.
 11. Rubio CA, Nylander G. Surgical resection of the rat colon: effects on carcinogenesis by 1,2-Dimethylhydrazine. *JNCI* 1982; 68 (5): 813-5.
 12. Roe R, Fermor B, Williamson RCN. Proliferative instability and experimental carcinogenesis at colonic anastomoses. *Gut* 1987; 28: 808-15.
 13. Umpleby HC, Williamson RCN. Anastomotic recurrente in large bowel cancer. *Br J Surg* 1987; 74: 873-8.
 14. Appleton GVN, Davies PW, Williamson RCN. El efecto de la desfuncionalización sobre la citocinética y el cáncer en las líneas de sutura del colon. *Br J Surg* 1990; 77: 768-72.
 15. Phillips RKS, Cook HT. Effect of steel wire sutures on the incidence of chemically induced rodent colonic tumours. *Br J Surg* 1986; 73: 671-4.
 16. Calderesi RN. Differential effects of surgical suture materials in 1-2 dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia. *Cancer Res* 1984; 44: 2827-30.

Influencia de la manipulación quirúrgica del colon en la carcinogénesis cólica inducida en ratas

J. F. Noguera Aguilar, I. Amengual Antich¹, A. Plaza Martínez², C. Tortajada Collado³, J. M. Morón Canis³ y J. J. Pujol Tugores

Servicio de Cirugía General. Hospital Son Llàtzer. Son Ferriol. ¹Servicio de Anatomía Patológica. Fundación Hospital Manacor. ²Servicio de Cirugía Vasculat. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia. ³Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca

RESUMEN

Objetivo: valorar la influencia de las distintas manipulaciones experimentales en un modelo de carcinogénesis cólica experimental con inducción farmacológica en la rata.

Diseño experimental: se emplearon 90 ratas Sprague-Dawley macho, divididas en tres grupos: no quirúrgico (n=30); quirúrgico con traumatismo cólico (n=20), y quirúrgico con anastomosis colocolica (n=40). La inducción carcinogénica se realizó con 1-2 dimetilhidrazina dihidrocloruro. Se identificaron los adenocarcinomas cólicos y se determinaron número de tumores, superficie tumoral y porcentaje de superficie tumoral. El análisis estadístico se realizó con modelos ANOVA de comparación de medias y con tablas de contingencia Chi cuadrado.

Resultados: el número de tumores fue mayor en el grupo quirúrgico que en el control, apareciendo preferentemente alrededor del colon manipulado. La superficie y el porcentaje tumorales fueron mayores en el grupo quirúrgico que en el control, siendo mayores a su vez en el grupo con anastomosis frente al grupo con traumatismo cólico. Dentro de los grupos con anastomosis, presentó mayor superficie y porcentaje tumoral el grupo con adición de titanio frente al grupo con material reabsorbible.

Conclusiones: la manipulación experimental del colon de la rata aumenta la carcinogénesis cólica farmacológicamente inducida. La creación de una anastomosis provoca un mayor incremento del proceso carcinogénico que la anastomosis simulada. Este proceso se ve además favorecido por la cantidad de material de sutura incluida en la anastomosis y por la naturaleza irreabsorbible de los materiales implantados en la línea anastomótica.

Palabras clave: Cáncer. Carcinogénesis. Colon. Anastomosis. Rata.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es el cáncer digestivo más frecuente en Europa Occidental y los Estados Unidos (1) y la segunda causa de muerte en el mundo occidental (2). En nuestro país posee una incidencia de 20-30 casos por 100.000 habitantes y año, siendo responsable del 20% de las muertes por procesos malignos (3,4). El 70-80% de los pacientes con cáncer colorrectal serán candidatos a cirugía con finalidad curativa; en el 20-30% restante sólo se podrá realizar cirugía paliativa (5,6).

La recurrencia locorregional del cáncer colorrectal es un problema importante dentro de la recidiva global de la enfermedad neoplásica (7-10). Para las recidivas anastomóticas tardías la explicación más adecuada parece ser la de la carcinogénesis metacrona a nivel anastomótico. Esta susceptibilidad de la anastomosis para la aparición de tumores metacronos o recurrencia local parece deberse a la proliferación celular aumentada en las criptas cólicas en vecindad de la anastomosis y al efecto irritante crónico de los materiales de sutura empleados (11-14).

Es tal la importancia del tema que conviene tener modelos experimentales de uso estandarizado que permita valorar los resultados de distintas manipulaciones encaminadas a variar la historia natural de la recidiva locorregional en el cáncer colorrectal (15,16).

El objetivo del estudio es valorar cómo puede influir la manipulación cólica experimental en un modelo de carci-

nogénesis cólica farmacológicamente inducida en la rata. Se valora además cuáles son las maniobras experimentales que pueden tener más influencia en este modelo de carcinogénesis, si el traumatismo cólico o la creación de una anastomosis colocólica, valorando la influencia de la cantidad de material y de la naturaleza de los materiales de sutura en la carcinogénesis inducida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 90 ratas Sprague-Dawley macho (de Criffa, España), con un peso medio de 185 g. Fueron divididas en tres grupos: no quirúrgico o control (n=30); quirúrgico con traumatismo cólico (n=20), y quirúrgico con anastomosis colocólica (n=40). En este último subgrupo podemos diferenciar varios tipos de manipulación al realizar la anastomosis: con sutura continua (n=10), sutura discontinua (n=10), sutura discontinua y adición de material reabsorbible (n=10), y sutura discontinua y adición de material irreabsorbible (n=10).

Para la anastomosis colocólica se empleó material de sutura no absorbible (polivinildifluoroetileno, monofilar 5/0, de Lorca-Marín, España). Para la adición de material reabsorbible en la anastomosis colocólica se emplearon 8 mg de ácido poliglicólico de forma laminar en dos fragmentos; mientras que para la adición de material irreabsorbible se emplearon 8 mg de titanio en forma filamentosa, en dos fragmentos.

La inducción carcinogénica de las neoplasias colónicas se realizó con 1-2 dimetilhidrazina dihidrocloruro (Sigma-Aldrich, España).

Condiciones dietéticas y ambientales

Las condiciones ambientales del estabulario fueron: periodo luz/oscuridad de 12/12 horas; temperatura de 22 ± 2 °C, y humedad relativa del 60-70%. La dieta suministrada fue dieta A.04 (Panlab, España).

Se cumplieron las directrices marcadas por el Real Decreto 223/1998 y por la Directiva de la Unión Europea 86/609/CEE, sobre la protección de animales utilizados para experimentación.

Método anestésico

Se empleó una solución de ketamina, atropina y diazepam (50, 10, 40% respectivamente), administrado a razón de 4 ml/kg por vía intramuscular.

Método quirúrgico

Se realizó laparotomía media de 3-4 cm de longitud en la parte inferior del abdomen, identificando el lugar de manipulación cólica a 4 cm del ano.

En el grupo con manipulación cólica se realizó trau-

matismo cólico en un grupo (n=20) y anastomosis colocólica término-terminal en el otro grupo (n=40).

El traumatismo cólico consistió en el traumatismo de la pared del colon simulando una anastomosis cólica; se practicaba ocho pasadas equidistantes con la aguja e hilo con que se confeccionaría la anastomosis, pasando por todo el espesor de la pared cólica, pero sin sección cólica ni abandono del material de sutura en el colon. En el grupo con anastomosis colocólica, se procedía a la sección cólica completa con posterior sutura con material irreabsorbible de calibre 5/0. Se colocaban ocho puntos equidistantes y se comprobaba la estanqueidad intraoperatoria de la anastomosis por vía endoanal.

En los grupos en que se añadía material adicional, reabsorbible (ácido poliglicólico) o irreabsorbible (titanio), este era incluido en forma de dos filamentos de 4 mg en las caras laterales al borde mesentérico, anclado en el punto de sutura, quedando así inmerso en la pared cólica.

Inducción carcinogénica, seguimiento y sacrificio

Los tumores cólicos se indujeron con 1-2 dimetilhidrazina dihidrocloruro (1-2 DMH, de Sigma-Aldrich, España). En el octavo día del postoperatorio los animales recibieron la primera de dieciocho inyecciones subcutáneas semanales de 1-2DMH, a una dosis de 25 mg/kg de peso.

Los animales eran examinados semanalmente y todos serían sacrificados en la semana 20 postoperatoria. El colon fue dividido en dos piezas: el colon perianastomótico (1 cm por encima y debajo de la línea anastomótica), y el resto del colon. Las piezas fueron fijadas en formol al 10% para su examen histológico.

Estudio de los tumores cólicos

Se determinaron tres parámetros: número de tumores, superficie tumoral y porcentaje tumoral (porcentaje de superficie cólica ocupada por tejido tumoral). Sólo los adenocarcinomas fueron incluidos en el estudio.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático SPSS. El análisis estadístico se realizó con modelos ANOVA de comparación de medias y con tablas de contingencia Chi cuadrado. Para la comparación de medias con ANOVA se empleó el ANOVA unifactorial con test de LSD más test de Scheffé o Bonferroni.

RESULTADOS

Mortalidad

La mortalidad global del estudio fue de 2 animales de los 90 estudiados, pertenecientes al grupo con anastomosis. Estos fallecimientos se debieron a cuadros oclusivos intestinales por las neoplasias inducidas.

Alteraciones al tránsito cólico

Aparecieron alteraciones al tránsito digestivo por oclusión cólica en 3 animales (3,33%). Dos de ellos fallecieron siendo realizado el estudio *postmortem*, y en un caso se adelantó el sacrificio por oclusión cólica. Los tumores cólicos anastomóticos fueron la causa de los cuadros obstructivos.

Número de tumores

Se obtuvieron un total de 185 adenocarcinomas cólicos en los 90 animales (2,05 tumores por animal). En el grupo sin intervención quirúrgica aparecieron un total de 25 tumores ($X=0,83$ tumores por animal); en el grupo con traumatismo cólico sin anastomosis se hallaron 44 tumores ($X=2,2$), mientras que en el grupo con anastomosis cólica encontramos un total de 116 tumores cólicos ($X=2,9$). Esta diferencia entre las medias de los tumores en función del grupo de estudio fue significativa (Fig. 1, $p<0,0005$, ANOVA, test LSD y Bonferroni).

En cuanto a la localización de los tumores cólicos, esta fue variable en los distintos grupos. En los grupos sin intervención quirúrgica aparecieron el 64% de los tumores en el colon proximal y en el grupo con traumatismo cólico sin anastomosis se hallaron el 68,18% de los tumores en el colon proximal.

Cuando se realizó anastomosis cólica, aparecieron en el área perianastomótica el 59,49% de los tumores.

Superficie tumoral

En el conjunto de los animales se obtuvieron 79,1 cm² de superficie cólica tumoral. En el grupo sin intervención quirúrgica aparecieron 9,13 cm² (0,30 cm² por animal), mientras que en el grupo con traumatismo cólico se obtuvieron 15,64 cm² ($X=0,78$ cm² por animal) y en el grupo con anastomosis colocólica aparecieron 54,319 cm², con una media de 1,36 cm². Las diferencias entre el grupo control y el grupo con anastomosis fueron relevantes ($p<0,001$, ANOVA, test LSD y Scheffé), no siéndolo las diferencias del control con el grupo con traumatismo cólico (Fig. 2).

Si consideramos el área perimanipulada (bien con traumatismo cólico o con anastomosis), en el grupo con traumatismo cólico se presentó el 17,64% de la superficie tumoral en esta zona del colon, mientras que en el grupo con anastomosis cólica el 62,06% de la superficie tumoral asentó en el área perianastomótica.

En cuanto a las diferencias obtenidas en los subgrupos con anastomosis en relación al material de sutura, en el grupo con sutura continua la media fue de 0,9 cm² por animal, en el grupo con discontinua 1,7 cm², en el grupo con titanio 2,2 cm² y en el grupo con material reabsorbible 0,6 cm² (Fig. 3, $p<0,05$, ANOVA, test LSD y Scheffé).

Porcentaje tumoral

Relacionando la superficie de tejido cólico tumoral con la superficie cólica del animal, obtenemos el porcentaje tumoral. En el grupo sin intervención este porcentaje tumoral fue del 2,99%, mientras que en el grupo con traumatismo cólico alcanzó el 8,63%, llegando el porcentaje tumoral hasta el 23,54% en el grupo con anastomosis colocólica. La diferencia entre el grupo con anastomosis y el control fue significativa (Fig. 4, $p<0,0005$, ANOVA, test LSD y Scheffé).

En el grupo con anastomosis cólica, el área perianastomótica presentó un 18,65% de tejido neoplásico, mientras que en el grupo con traumatismo se obtuvo un 2,25% de tejido tumoral en esta área.

Considerando por separado al grupo con anastomosis colocólica, el mayor porcentaje tumoral apareció en el grupo con titanio (39,8%), seguido por el grupo con sutura discontinua (27,7%) y con sutura continua (15,2%), siendo el menor porcentaje para el grupo con adición de material reabsorbible (11,1%) (Fig. 5, $p<0,05$, ANOVA, test LSD y Scheffé).

Material de sutura en la línea anastomótica

En los grupos en que se realizó anastomosis colocólica, existió una relación positiva entre la longitud de sutura que quedaba incluida en la línea anastomótica y la superficie y porcentaje tumoral hallados en el estudio histológico. A mayor cantidad de material de sutura incluido en la línea anastomótica, apareció mayor superficie y porcentaje tumoral cólico.

Si consideramos el grupo con adición de material reabsorbible en la línea anastomótica, apreciamos que presenta menos superficie y porcentaje tumoral que el resto de grupos, mostrando una influencia protectora de este material en la carcinogénesis.

Estudio histológico

Excepto dos casos de adenocarcinoma en anillo de sello (1,08%), el resto fueron adenocarcinomas no específicos. Los adenocarcinomas fueron bien diferenciados en el 56,94% de los casos, moderadamente diferenciados en 35% y pobremente diferenciados en el 8,06% de los casos. En cuanto al nivel de invasión, la mayoría alcanzaban la submucosa (53,33%), siendo *in situ* el 30,00% y siendo invasores más allá de la submucosa en el 16,66%. Si relacionamos este nivel de invasión con los grupos de estudio, encontramos que los tumores son más invasivos en el grupo con anastomosis cólica que en el grupo control ($p<0,05$, Chi cuadrado). Se aislaron un total de 320 ganglios epicólicos (3,5 ganglios por rata), albergando micrometástasis por adenocarcinoma 7 de ellos. Esto supone un 2,18% de positividad para micrometástasis en los ganglios totales evaluados, y que el 3,78% de los adenocarcinomas evaluados tenían afectación ganglionar epicólica, todos ellos en el grupo con anastomosis colocólica.

DISCUSIÓN

En el presente modelo experimental, la carcinogénesis inducida experimentalmente no puede obedecer a fenómenos de metástasis implantada en el área manipulada, ni a defectos de técnica quirúrgica, pues no se actúa sobre una neoplasia primaria preexistente. Todos los tumores cólicos inducidos experimentalmente en los animales obedecen a un fenómeno de inducción y promoción carcinogénica derivada del efecto de la 1-2 dimetilhidracina. Este efecto será más intenso en unos grupos u otros en función de las variables experimentales que se hayan realizado.

Analizamos una variedad de manipulaciones experimentales frente al grupo control que nos servirá para evaluar la influencia de la manipulación cólica en la carcinogénesis inducida, bien de forma genérica (grupo quirúrgico frente al control), o bien de forma específica (anastomosis frente a control y frente a traumatismo, y comparación de las distintas modalidades de anastomosis entre ellas).

Todas las complicaciones postoperatorias y la mortalidad en el estudio aparecieron en el grupo quirúrgico, y más concretamente en el grupo con anastomosis. Todas ellas debidas a adenocarcinomas perianastomóticos. La mortalidad global en el estudio fue de 2,22% y la aparición de cuadros oclusivos intestinales fue de 3,33%.

La proliferación neoplásica cólica se evaluó con tres parámetros; el número de tumores, la superficie de tejido tumoral cólico y el porcentaje de tejido tumoral. El número es el menos fiable de los tres indicadores por la variabilidad en el tamaño de los tumores y en el tamaño del colon del animal. La superficie tumoral se aproxima más a la cantidad de tejido neoplásico inducido, pero es el porcentaje de tejido tumoral el parámetro más adecuado para la cuantificación del proceso carcinogénico, pues evalúa la superficie tumoral en relación al tamaño global del colon de cada animal por separado.

El número de tumores cólicos inducidos fue de 185 adenocarcinomas. En el grupo con manipulación experimental aparecieron mayor número de tumores que en el control (2,55 tumores por animal frente a 0,83). Esta mayor incidencia en el número de tumores en el grupo intervenido fue significativa. Al considerar el grupo control y los grupos con traumatismo cólico aislado y con anastomosis cólica, las diferencias fueron también relevantes.

Apreciamos que la manipulación cólica experimental aumenta el número de tumores inducidos farmacológicamente respecto al grupo control, y que la creación de una anastomosis colocolica origina más tumores que la anastomosis simulada, provocando además un agrupamiento de los tumores inducidos en el área perianastomótica. No se vieron diferencias significativas en el número de tumores entre los grupos con distintas modalidades de anastomosis.

Si atendemos a la superficie tumoral, observamos que existe mayor superficie tumoral en el grupo con manipulación experimental que en el grupo control, diferencia esta que es relevante. Al comparar los grupos control, traumatismo cólico y anastomosis cólica, las diferencias

sólo son valorables para el grupo con anastomosis respecto al control. Al analizar las diferencias entre las distintas modalidades de anastomosis, sólo encontramos diferencias significativas entre los grupos con adición de titanio o de material reabsorbible.

Si la creación de una anastomosis colocolica fue la manipulación que originó más superficie tumoral, la adición de material irreabsorbible en la línea de sutura contribuye claramente en esta inducción.

En lo que respecta al porcentaje tumoral, vemos un claro y significativo aumento en el porcentaje tumoral cólico en el grupo con manipulación experimental frente al control.

Si separamos los grupos intervenidos en grupo con traumatismo y grupo con anastomosis y los comparamos junto al grupo control, se obtiene idéntico resultado que para la superficie tumoral; la creación de la anastomosis cólica aumenta el porcentaje tumoral cólico de manera significativa frente al grupo control.

El grupo con anastomosis cólica presentó diferencias entre sus subgrupos, hallando mayor porcentaje tumoral en el grupo con adición de titanio (39,8%), seguido por los grupos con sutura discontinua (27,7%), sutura continua (15,2%) y adición de reabsorbible (11,1%). Las diferencias fueron significativas entre los grupos con adición de material reabsorbible frente al grupo con adición de titanio.

Estas diferencias halladas vienen a reforzar que la cantidad de material incluido en línea de sutura influye en la inducción y/o promoción de la carcinogénesis, y que este fenómeno aumenta cuanto mayor sea el material irreabsorbible incluido en la anastomosis.

El estudio histológico de los tumores muestra diferencias cuando valoramos el nivel de invasión de los adenocarcinomas. En el grupo con anastomosis los tumores son más invasivos que en el grupo control; al considerar por separado las distintas modalidades de anastomosis cólicas, no se apreció influencia en la invasión tumoral.

En relación a la afectación metastásica ganglionar, sólo se halló invasión ganglionar de los ganglios epicólicos en el grupo con anastomosis. Esto refuerza el hecho de que la creación de la anastomosis genera tumores más invasivos y agresivos que el traumatismo aislado o el control sin intervención quirúrgica.

Podemos concluir que la manipulación experimental del colon de la rata aumenta la carcinogénesis cólica farmacológicamente inducida, provocando la creación de una anastomosis colocolica un mayor incremento del proceso carcinogénico que la anastomosis simulada. Este proceso de inducción y promoción neoplásica perianastomótica se ve además favorecido por la cantidad de material de sutura incluido en la anastomosis y por la naturaleza irreabsorbible de los materiales implantados en la línea anastomótica. Todas estas situaciones experimentales pueden favorecer el proceso carcinogénico no sólo en su intensidad, sino influyendo además en la naturaleza de este proceso, induciendo tumores más invasivos y con mayor capacidad de provocar metástasis ganglionares.