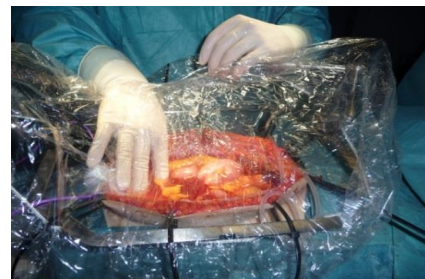
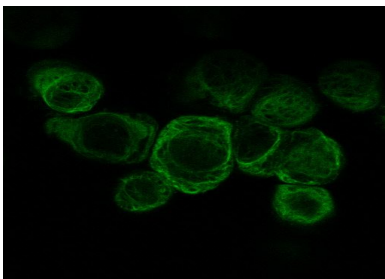


FACTOR PRONÓSTICO DE LA  
DETERMINACIÓN DE CÉLULAS  
TUMORALES CIRCULANTES (CTCs)  
EN PACIENTES CON  
CARCINOMATOSIS PERITONEAL DE  
ORIGEN COLÓNICO TRATADOS  
CON CIRUGÍA CITORREDUCTORA  
MÁS QUIMIOTERAPIA  
INTRAPERITONEAL  
INTRAOPERATORIA HIPERTÉRMICA  
(CRS+HIPEC).

Álvaro Morales González  
Granada, 2016

Tesis Doctoral



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Álvaro Morales González  
ISBN: 978-84-9125-780-6  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/46535>





FACTOR PRONÓSTICO DE LA  
DETERMINACIÓN DE CÉLULAS  
TUMORALES CIRCULANTES (CTCs) EN  
PACIENTES CON CARCINOMATOSIS  
PERITONEAL DE ORIGEN COLÓNICO  
TRATADOS CON CIRUGÍA  
CITORREDUCTORA MÁS QUIMIOTERAPIA  
INTRAPERITONEAL INTRAOPERATORIA  
HIPERTÉRMICA (CRS+HIPEC).

Álvaro Morales González

Granada, 2016

Tesis Doctoral



**Dña. María José Serrano Fernández**, Investigadora principal del grupo de “Biodinámica de Células TumORAles Circulantes, Microambiente Tumoral y metástasis” en el centro centro Pfizer-UGR-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO), Granada.

**D. Juan Torres Melero**, Doctor en Medicina y Cirugía y actual responsable de la Unidad de Cirugía Oncológica Peritoneal del Complejo Hospitalario Torrecárdenas de Almería.

**Certifican que:**

D. Álvaro Morales González, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado la Tesis Doctoral “ Factor pronóstico de la determinación de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con carcinomatosis peritoneal de origen colónico tratados con cirugía citorreductora más quimioterapia intraperitoneal intraoperatoria hipertérmica (CRS+HIPEC) ” en el centro GENyO y en la UGC de Cirugía del Complejo Hospitalario Torrecárdenas, para aspirar al grado de Doctor en Medicina. Este trabajo de investigación reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado.

En Granada, a 02 de Septiembre 2015.

Dra Maria José Serrano Fernández

Dr. Juan Torres Melero

Doctorando: Álvaro Morales González





El Doctorando **D. Álvaro Morales González** y los directores de la tesis; **Dña Maria José Serrano Fernández y D. Juan Torres Melero.**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que:

El trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 02 de Septiembre de 2015.

Dña. Maria José Serrano Fernández

D. Juan Torres Melero.

D. Álvaro Morales González.



## **Agradecimientos**

En primer lugar agradecer a la Dra. María José Serrano por su confianza, apoyo, tiempo y dedicación a este proyecto y a mi, sin ella nada hubiera sido posible.

En segundo lugar al Dr. Juan Torres Melero, infinita su paciencia, dedicación e interés por todo lo que hace. Capaz de contagiar este entusiasmo a todo aquel que lo rodea. Así, las cosas, son muy fáciles.

A mis padres, quienes me han dado todo lo que tengo, y quienes siempre han confiado en mí.

A Anto, por estar a mi lado en todo momento, saber apoyarme, sacar lo mejor de mí y aguantarme.

A todas y cada una de las personas que ha influido en mi formación a lo largo de toda esta carrera de fondo.

Gracias a todos los integrantes del GENyO, grandes profesionales y personas, que verdaderamente salvan vidas y llevan a cabo una labor más que admirable, trabajando sin parar día y noche.



A mis padres

A mis "padrinos" , Fede y Jose Luís

A mi Anto.



# ÍNDICE





## Indice

Abreviaturas	21
1) Introducción	29
1.1 Introducción	31
1.2 Cáncer de colon	33
1.3 Peritoneo	38
1.3.1 Concepto	38
1.3.2 Histología	39
1.3.3 Compartimentos	41
1.3.4 Transporte peritoneal	43
1.3.5 Adhesión Mesotelial	44
1.4 Carcinomatosis peritoneal	47
1.4.1 Definición	47
1.4.2 Diseminación	48
1.4.3 Diagnóstico de CP	50
1.4.3.1 TAC	50
1.4.3.2 PET	52
1.4.3.3 Laparoscopia Exploradora	53
1.4.3.4 Marcadores Tumorales	55
1.4.4 Estadificación del Grado de CP	56
1.4.4.1 Índice de CP Sugarbaker	57
1.4.4.2 Sistema de estadificación de Lyon	58
1.4.4.3 PCI simplificado Grupo Holandés	59
1.4.4.4 Clasificación de la Japanese Research Society for Gastric Carcinomatosis Staging (JRSGS)	59
1.5 Tratamiento Multidisciplinar	60
1.5.1 Selección de pacientes	60
1.5.2 Procedimiento quirúrgico	63
1.5.2.1 Citorreducción (CRS)	63
1.5.2.2 Quimioterapia Intraperitoneal Intraoperatoria Hipertérmica (HIPEC)	75
1.6 Células Tumorales Circulantes en Sangre periférica (CTCs)	86
2) Hipótesis de trabajo	107
3) Objetivos	111
4) Material y Métodos	115
4.1 Ámbito del estudio y pacientes	117
4.2 Criterios de inclusión y exclusión	117
4.3 Variables a estudiar	119
4.3.1 Variables independientes	120
4.3.2 Variables dependientes	123
4.4 Muestras empleadas	123

4.4.1 Muestras de sangre de los pacientes	124
4.4.2 Controles negativos	124
4.4.3 Líneas celulares de cáncer de colon	124
4.4.4 Controles positivos	125
4.5 Análisis realizados sobre las muestras de sangre	127
4.6 Procedimientos técnicos	128
4.6.1 Cultivo in vitro de líneas celulares	128
4.6.2 Aislamiento y enriquecimiento celular	129
4.6.3 Selección positiva inmunomagnética	131
4.6.4 Detección de CTCs mediante tinción cromogénica	138
4.6.5 Tinción inmunocitoquímica	141
4.7 Análisis estadístico	145
4.8 Medios y recursos disponibles para realizar el estudio	146
4.8.1 Material inventariable	146
4.8.2 Material bibliográfico	148
4.8.3 Personal	148
5) Resultados	149
5.1 Características de los pacientes	151
5.2 Detección y Caracterización de las CTCs	151
5.3 Correlación entre las características clínico-patológicas y la presencia de CTCs	152
5.4 Correlación entre estatus EGRF en CTCs y características clínico patológicas.	158
5.5 Factor pronóstico de la enumeración y análisis de las CTCs	159
6) Discusión	163
7) Conclusiones	175
8) Bibliografía	179





# Abreviaturas



ATCC: American Type Culture Collection

ASA: Escala de riesgo anestésico, acrónimo del Inglés American Society of Anesthesiologist

BRAF: Gen que codifica para una proteína implicada en la señalización del receptor del Factor de Crecimiento epidérmico

Ca 19.9: Antígeno Tumoral

CC Score: Clasificación de citorreducción quirúrgica, acrónimo del inglés Completeness Cytoreductive Score

CD44, 45, 47: Glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular.

CEA: Antígeno Carcinoembrionario.

CK 20: Citoqueratina 20, identificador de células tumorales colorrectales.

Cm: Centímetros

CP: Carcinomatosis Peritoneal.

CRS + HIPEC: Citorreducción quirúrgica más Quimioterapia hipertérmica intraoperatoria intraperitoneal.

CTCs: Células Tumorales Circulantes.

Da: Daltons

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. Acrónimo derivado de su nombre en Inglés Epidermal Growth Factor Receptor.

EMT: Transición epitelio-mesénquima. Acrónimo derivado de su nombre en Inglés Epithelial Mesenchymal Transition

EpCAM: Molécula de adhesión de células epiteliales. Acrónimo derivado de su nombre en Inglés Epithelial Cell Adhesion Molecule.

ER: Receptor de estrógenos

FDA: Administración de drogas y alimentos. Acrónimo derivado de su nombre en Inglés Food and Drug Administration

G: Fuerza de la Gravedad



GLUT 1-9: Proteínas transportadoras de Glucosa, acrónimo del inglés.

HER2: Factor de Crecimiento Epitelial Humano 2

HGF: Hepatocyte Growth Factor

ICAM 1: Molécula de Adhesión Intercelular 1, acrónimo de inglés.

Ig G, M, A, D, E: Inmunoglobulinas G, M, A, D, E

JRSGS: Sociedad Japonesa de investigación de la carcinomatosis de cáncer gástrico, acrónimo del Inglés.

KRAS: Gen que elabora la proteína homónima, la cual participa en las vías de señalización celular , crecimiento y apoptosis.

MACS: Acrónimo en inglés de Model-Based analysis of ChIP- Seq

Mg: miligramos

MmHg: Milímetros de Mercurio

MMP 7-9: Metaloproteasas 7-9

NCCN: National Comprehension Cancer Network

NCI: National Cancer Institute

Nm: Nanometros

PBS: Tampón Fosfato Salino, acrónimo del Inglés Phosphate Buffered Saline

PCI: Índice de Carcinomatosis Peritoneal, acrónimo del Inglés.

PECAM-1: Molécula de adhesión expresada por las plaquetas, acrónimo del inglés Platelet endothelial cell adhesion molecule.

PET: Tomografía por emisión de positrones, acrónimo del Inglés.

PIK3CA: Gen que codifica la proteína homónima, acrónimo del Inglés Phosphatidylinositol- 4,5- Biphosphate 3-KInase.

Plastín 3: Proteína altamente conservada codificada por el gen PLS-3.

PMN: Polimorfo nuclear

PR: Receptor de Progesterona

RPM: Revoluciones por minuto

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SCPI: Clasificación simplificada del índice de carcinomatosis, acrónimo del inglés.

SF: Scatter Factor

SUV: Valor de captación estandarizado, acrónimo del Inglés Standardized Uptake Value

TAC: Tomografía Axial Computerizada

TNM: Sistema de clasificación tumoral por Tamaño del tumor-afectación de los Nódulos linfáticos- Metástasis a distancia

UGC: Unidad de Gestión Clínica

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VCAM-1: Acrónimo del inglés Vascular Cell Adhesion Protein 1.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular , acrónimo del inglés.

$\mu$ : Micras

$\mu$ l: Microlitro



# 1 ) INTRODUCCIÓN



## **1.1 INTRODUCCIÓN**

La Ciencia Médica está en continuo cambio, y gracias a los nuevos avances y a las nuevas teorías, se van desarrollando nuevos enfoques, nuevas terapias que han permitido que pacientes que, en cierto momento de la historia médica han sido considerados desahuciados, hoy puedan beneficiarse de nuevos planteamientos terapéuticos.

Tradicionalmente los pacientes con carcinomatosis peritoneal (CP) han sido considerados como pacientes portadores de una enfermedad avanzada, candidatos únicamente a tratamiento paliativo.

Con el estudio de la fisiopatología de estas lesiones, y de sus mecanismos de implantación y de diseminación, se produjo un cambio en la concepción de la misma, pasando a considerarse como una enfermedad locorregional para la que se estableció, por parte del Dr. P. H. Sugarbaker, un nuevo tratamiento multidisciplinar, el cual presentaba unos mejores resultados frente al tratamiento quimioterápico, siempre y cuando se lleve a cabo una exhaustiva selección de los pacientes dado que no es una cirugía exenta de morbi-mortalidad (1).

No obstante, es necesario buscar factores que nos ayuden a determinar el pronóstico de estos pacientes y poder así realizar un esfuerzo quirúrgico máximo.

Al respecto, las células tumorales circulantes (CTCs) están consideradas en la actualidad, como unos nuevos marcadores tumorales, indicadores de una posible formación de metástasis a distancia, lo cual excluiría a estos pacientes de una posible terapia intraperitoneal.

Pero aún más, estas CTCs, se han considerado como un pre-estadio de la manifestación de metástasis a distancia de una forma clínica, lo que aumenta aún más su valor como predictor de las mismas.

Además, desde un punto de vista pronóstico, estas podrían considerarse como “biopsias sanguíneas” (biopsias líquidas) de cara a la determinación de una terapia individualizada.



## **1.2 CÁNCER DE COLON**

El cáncer de colon es el tercero en incidencia en varones, por detrás del de próstata y pulmón. En la mujer, es el segundo por detrás del de mama. Sumando la incidencia en ambos sexos, es el más frecuente, con una prevalencia de 26.500 casos/año en España, y representa dos tercios de todos los cánceres colorrectales, ocupando el primer lugar como causa de muerte por cáncer (2).

La mayoría de la población diagnosticada está comprendida entre los 65 y los 75 años, con un máximo a los 70 años. Los casos en edades más tempranas, suelen estar incluidos en aquellos con predisposición genética.

En torno al 20% parece estar en relación con factores familiares, presentando un mayor riesgo los parientes de primer grado con antecedente familiar de adenomas colorrectales o cáncer colorrectal invasivo.

Existen evidencias experimentales, epidemiológicas y clínicas que demuestran que la dieta influye en el desarrollo de cáncer colorrectal, debido a mutágenos y carcinogénicos. El consumo elevado de carne roja incrementa el riesgo debido a la formación de nitrosaminas. Además el alcohol, tabaco y obesidad también han demostrado ser factores de riesgo.

Suele ser una enfermedad silente, con diversas manifestaciones clínicas en función de su localización, así bien el cáncer de colon derecho suele manifestarse como anemia, alteraciones en el hábito, clínica compresiva; el

cáncer de colon de izquierdo suele presentar clínica de estreñimiento con rectorragia. El diagnóstico definitivo se establece por colonoscopia, la cual debe ser completa para descartar neoplasias sincrónicas (8-10%) y permite además biopsiar la lesión para realizar estudio anatomopatológico (3).

La estadificación preoperatoria debe realizarse con una TAC toracoabdominal con contraste intravenoso y oral, para poder detectar la presencia de enfermedad a distancia y evaluar su situación real respecto a las estructuras vecinas. La determinación del antígeno carcinoembrionario (CEA) será útil sobretodo para el seguimiento.

**Tabla 1. Definiciones para T, N, M**

<b>Tumor primario (T)</b>	
TX	Tumor primario que no se puede evaluar
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia <sup>a</sup>
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la capa muscular propia (muscularis propria)
T3	El tumor penetra la capa muscular propia hacia los tejidos pericólicas
T4a	El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral <sup>b</sup>
T4b	El tumor invade directamente o se encuentra adherido a otros órganos o estructuras <sup>b,c</sup>
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
NX	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar
N0	No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Metástasis en un ganglio linfático regional
N1b	Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales
N1c	Depósito(s) tumoral(es) en la subserosa, mesenterio o en los tejidos pericólicos o perirrectales no recubiertos por el peritoneo, sin metástasis ganglionar regional.
N2	Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
N2b	Metástasis en siete o más ganglios linfáticos regionales
<b>Metástasis distante (M)</b>	
M0	Sin metástasis distante
M1	Metástasis distante
M1a	Metástasis confinada a un órgano o área (por ejemplo, hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional)
M1b	Metástasis en más de un órgano/área o en el peritoneo.

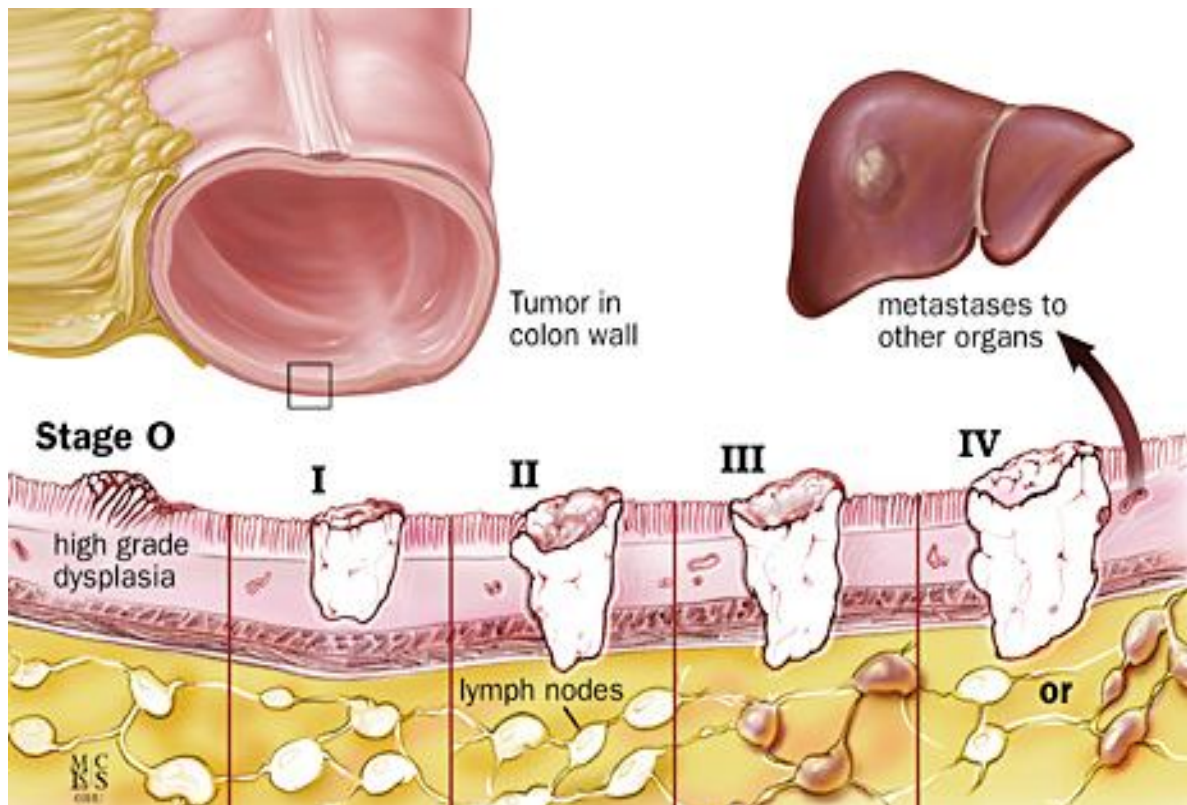
**Tabla 2. Grupos de estadio anatómico/pronóstico**

Estadio	T	N	M	Dukes*	MAC*
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	-	-
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	-	-

Nota: cTNM es la clasificación clínica y pTNM es la clasificación patológica. El prefijo "y" se usa para aquellos cánceres que se clasifican luego de un pretratamiento neoadyuvante (por ejemplo, ypTNM). Los pacientes que tienen una respuesta patológica completa (ypT0N0cM0) pueden ser similares al grupo en estadios 0 o I. El prefijo "r" se debe usar en aquellos cánceres que recidivaron luego de un intervalo libre de la enfermedad (rTNM).

\*Dukes B es una combinación de los mejores (T3 N0 M0) y los peores (T4 N0 M0) grupos de pronóstico, así como el Dukes C (cualquier T N1 M0 y cualquier T N2 M0). MAC es la clasificación modificada de Astler-Coller.

(Figura 1. Clasificación TNM. Adaptación de American Joint Committee on Cancer. 7 Ed.2010.)



(Figura 2: Estadío Tumoral del Cáncer de Colon. Adaptación Portal de Salud de la Comunidad de Madrid)

El manejo del cáncer de colon es un claro ejemplo de manejo multidisciplinar, desde el primer escalón que sería el médico de Atención Primaria y/o el gastroenterólogo hasta llegar a cirujanos y oncólogos.

Después del hígado, el peritoneo constituye el lugar más frecuente de diseminación tumoral en neoplasias colorrectales. De hecho, un 25% de pacientes presentan sólo afectación de este órgano.

La incidencia de CP en el cáncer de colon en el momento del diagnóstico se estima en torno a un 8-17% de los pacientes (carcinomatosis sincrónica), y la recidiva posterior en pacientes tratados con cirugía y

sometidos a ciclos de quimioterapia y catalogados como supuestamente curados, asciende hasta el 50% (carcinomatosis metacrónica). Además hasta en un 25% de pacientes, la recidiva es exclusivamente en cavidad peritoneal, aún después de un estudio detallado de extensión (4).

En relación con la fisiopatología de la CP de origen gastrointestinal-ginecológico, existen dos maneras de producir la diseminación a la cavidad peritoneal: a) cuando el tumor presenta invasión completa del espesor de la pared del intestino, por perforación o diástasis y b) de forma iatrogénica durante la cirugía, debido a las maniobras propias de la disección. En esta diseminación intervendrían varios genes y proteínas que confieren características intrínsecas a estas específicas células tumorales, que junto con la interacción con el microambiente de la zona, favorecen el desarrollo de lesiones metastásicas en el peritoneo (5).

Durante la última década, se está consiguiendo un significativo aumento de la supervivencia en un grupo seleccionado de pacientes, motivado por los importantes progresos en el manejo de metástasis colorrectales desde el punto de vista quimioterápico, junto con los nuevos avances en el tratamiento quirúrgico de las mismas,

Hoy por hoy las opciones terapéuticas de la CP son: a) Quimioterapia Sistémica, b) cirugía paliativa y c) cirugía de citorreducción completa más quimioterapia hipertérmica intraoperatoria intraperitoneal (CRS+HIPEC).

Respecto a los estudios publicados sobre el tratamiento con quimioterapia sistémica con o sin cirugía paliativa, el estudio EVOCAPE y más recientes los de Jayne et al (6, 7), comunican una mediana de supervivencia entre 5 y 9 meses. Durante mucho tiempo la CP de origen colorrectal había sido considerada una situación terminal, sin posibilidades de curación, y por tanto se trataba únicamente con quimioterapia sistémica, de una forma paliativa obteniendo unos resultados en cuanto a supervivencia y calidad de vida muy limitados.

En los últimos 20 años se ha producido una mejora en el manejo de la enfermedad colorrectal por el uso de nuevas drogas como el Irinotecán/oxaliplatino, que junto a los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el VEGF y el EGFR , se han constituido como la base fundamental del tratamiento, consiguiendo medianas de supervivencia de hasta 24 meses. No obstante la mayoría de las series publicadas hacen referencia a pacientes con enfermedad metastásica hepática y pulmonar, teniendo pocos datos de pacientes con sólo enfermedad peritoneal. La cirugía paliativa en estos casos se orienta únicamente al control de la sintomatología/complicaciones, principalmente obstrucción y/o perforación.

Con el cambio de visión de la enfermedad propuesto por el Dr. Sugarbaker, esta enfermedad pasa a considerarse como locorregional, lo que permitió diseñar un tratamiento multidisciplinar local.

Hoy día la CRS + HIPEC está considerada como el tratamiento del mesotelioma peritoneal maligno, y del pseudomixoma peritoneal. Además en varios países también está considerada el “gold estándar” en el tratamiento de la CP de origen colorrectal (8, 9, 10, 11).

### **1.3 PERITONEO.**

#### **1.3.1 CONCEPTO**

El peritoneo se define como una membrana serosa que reviste las paredes de la cavidad abdominopélvica además de la pared de los órganos contenidos por esta.

Aunque es continua, ofrece dos porciones distintas entre sí, el peritoneo parietal que recubre las paredes de la cavidad abdominopélvica y el peritoneo visceral que se extiende por la superficie de las vísceras alojadas en el abdomen.

La hoja parietal esta tapizada por una capa conjuntiva que la hace despegable en toda su extensión, mientras que la hoja visceral es despegable con facilidad solo en ciertos puntos.

Su superficie oscila entre uno y dos metros cuadrados, lo que se corresponde con la superficie corporal total. La cavidad peritoneal se subdivide en espacios comunicados por los ligamentos peritoneales, los cuales son coronarios hepáticos, gastrohepático, falciforme, gastrocólico, duodenocólico, gastroesplénico, esplenorrenal y frenocólico, además del mesocolon transversal y el mesenterio del intestino delgado. Debido a estas estructuras la cavidad

abdominal se subdivide en 8 posibles espacios que serían el subfrénico derecho e izquierdo, subhepático, supramesentérico, gotieras paracólicas derecha e izquierda, pelvis y transcavidad de los epiplones. Estos espacios, ligamentos y mesenterios condicionan la circulación del líquido dentro del peritoneo y predicen la vía de propagación de las infecciones y de la enfermedad peritoneal (12). En condiciones normales la cavidad peritoneal contiene aproximadamente entre 50 y 100 centímetros cúbicos de líquido seroso estéril, el cual es producido por las células mesoteliales peritoneales (13).

### **1.3.2. HISTOLOGIA**

Al igual que el resto de capas serosas de la economía, el peritoneo esta constituido por 2 capas: una superficial de naturaleza endotelial y una capa más profunda de naturaleza conjuntiva.

#### **a) Capa endotelial:**

Constituida por células planas, transparentes de contornos poligonales, conformadas en una sola hilera. De bordes irregulares, su altura es de 1 o 2 micras y su anchura por termino medio de 40 a 50  $\mu$ .

Presentan un núcleo ovalado de unas 10 – 12  $\mu$  de longitud por 4 - 5  $\mu$  de espesor. Estas células de endotelio se componen de dos partes, una superficial y la otra profunda. La superficial, representada por una delgada lámina de citoplasma condensado, limita la célula del lado de la cavidad serosa, lo cual se conoce como “placa cobertura de Kolossow”. La más profunda se encuentra formada por un retículo protoplasmático, cuyas mallas

están repletas de una sustancia clara y amorfa, con afinidad por los colorantes. Este emite prolongaciones que constituyen verdaderos puentes celulares.

b) Capa Conectiva:

Es una capa delgada, que mide por término medio de 50 a 60  $\mu$ . La cara superficial sirve de base al endotelio y la profunda se relaciona con el tejido celular subperitoneal. Esencialmente se compone de fibras conjuntivas y elásticas reunidas por sustancia amorfa.

Las fibras conjuntivas se unen formando haces más o menos voluminosos, dispuestos paralelamente a la superficie libre de la membrana, y que nunca se anastomosan entre sí. En las zonas donde la serosa es gruesa, se disponen en varios planos, al contrario que ocurre en zonas delgadas, donde se disponen en un único plano.

Las fibras elásticas delgadas, ramificadas y en este caso, sí anastomosadas entre sí, forman un conjunto abundante de red. Esta red se encuentra en todo el espesor de la trama peritoneal, pero es en su cara profunda, donde es mayor el desarrollo. Aquí se forma como una capa especial, cuyo espesor es de 10 a 30  $\mu$ , siendo más gruesa en función de la movilidad del órgano a recubrir.

La sustancia amorfa, ocupa los intervalos entre ambas capas y sus elementos. Su grosor es de entre 1 y 3  $\mu$ .

c) Capa Subperitoneal:

Se encuentra debajo del peritoneo, unido a la serosa, el cual es un tejido conjuntivo laxo. Capa más o menos rica en grasa que varía de espesor según



el punto en el que nos encontremos, siendo muy desarrollada bajo el peritoneo parietal y mucho más delgada a nivel de las vísceras. No está presente en el hígado ni en el bazo, ni en su vertiente parietal a nivel del centro frénico (14).

### **1.3.3. COMPARTIMENTOS**

La cavidad peritoneal, desde un punto de vista estructural y dinámico, debe de comprenderse como un sistema tricompartmental, incluyendo los compartimentos mesotelial, vascular y linfático, los cuales interaccionan y coexisten entre sí.

#### **a) Compartimento Mesotelial**

Formado por una capa de células mesoteliales, las cuales actúan como centinelas y que pueden sentir y responder señales dentro de su microambiente. Secretan glicosaminoglicanos y surfactante para así permitir a las superficies mesoteliales parietales y viscerales el poder deslizarse entre sí. También tiene la propiedad de poder realizar transporte activo de células, partículas y fluidos. Sintetiza y secreta mediadores inflamatorios en respuesta a la agresión celular y protege de la diseminación de células tumorales.

Esta integrado por células mesoteliales en su gran mayoría alternado con células cuboideas secretoras. Entre dichas células mesoteliales se pueden encontrar comunicaciones de la superficie peritoneal con el espacio submesotelial, se conocen como “stomatas”. Las células mesoteliales pueden transformarse en mesenquimales, perdiendo las características de las células epiteliales y adoptando las de los fibroblastos. Esto se ha observado en

pacientes sometidos a diálisis peritoneal de forma ambulatoria, lo cual sería respuesta a estímulos de citoquinas liberadas localmente.

#### b) Compartimento Vascular

Aparece constituido por una red capilar submesotelial, donde el endotelio esta cubierto por una capa de glicoproteínas, llamada glicocálix, el cual actúa como barrera de protección con carga eléctrica específica. Esta barrera solo permite el paso de pequeñas de moléculas muy pequeñas desde la luz del capilar hacia el intersticio de aproximadamente 5500Da, aunque si se ve alterada, por citoquinas o fármacos como la adenosina, los cuales destruyen el glicocálix, la permeabilidad se ve aumentada y permite la fuga de moléculas mayores.

Desde un punto de vista estructural, se considera que el principal mecanismo de la barrera peritoneo-plasmática es el constituido por la pared de los capilares sanguíneos submesoteliales y por su intersticio, y en un segundo lugar por el mesotelio peritoneal (15).

#### c) Compartimento Linfático

El sistema linfático, colecciona fluidos, proteínas, y otras macromoléculas que posteriormente pasan a la circulación sistémica. Los linfáticos más pequeños están formados por una sola capa de endotelio. Dicha red linfática está organizada como un plexo, a lo largo de la superficie submesotelial y drena a los vasos linfáticos.

Se considera que los mecanismos implicados en la formación de linfa son dos, uno de ellos la presión intersticial negativa, la cual contrasta en

condiciones normales con la abdominal de 0-1 mmhg, y el segundo la concentración de proteínas a nivel de los linfáticos, lo que representa mayor presión oncótica a dicho nivel y por tanto condiciona el paso de agua y otras moléculas, desde el abdomen hacia la red linfática submesotelial (14).

#### **1.3.4. TRANSPORTE PERITONEAL**

La diseminación transcelómica de la células tumorales, tiene una ruta conocida y se sustenta en la dinámica de flujos del líquido peritoneal normal, en la fuerza de la gravedad y en la capacidad de migración de las células tumorales libres per sé.

El líquido peritoneal se mueve en el sentido de las agujas del reloj, es decir desde flanco izquierdo hacia pelvis, de ahí hacia gotiera derecha y asciende al espacio subdiafragmático. Este líquido es impulsado en parte por el movimiento del diafragma. Los poros intercelulares del peritoneo, que cubren la cara inferior del diafragma (“stomatas”), comunican con los depósitos linfáticos intradiafragmáticos. La linfa de dichos conductos, fluye a través de los vasos linfáticos o pleurales hasta ganglios locorregionales y finalmente al conducto torácico. Durante la espiración el diafragma se relaja y esto conlleva la apertura de dichos orificios, que junto con la presión intratorácica negativa, impulsa el líquido y las partículas, incluidas células, hacia los estomas. Cuando en la fase de inspiración se contrae, impele la linfa de los conductos mediastínicos al conducto linfático torácico, desplazando el líquido peritoneal en sentido cefálico.

Además, también existen fenómenos de desplazamiento de las células tumorales por si mismas, una motilidad inherente gracias a la lamellipodia y la filipodia, fuerza generada por la polimerización de microfilamentos de actina, estimulado por la unión de factores de crecimiento a la membrana celular (16,17).

### **1.3.5. ADHESIÓN MESOTELIAL**

Las células tumorales que se encuentran libres en la cavidad peritoneal pueden unirse a células mesoteliales que recubren el peritoneo sano, a la matriz extracelular o a estructuras especializadas como serían el omento mayor y el peritoneo diafragmático.

Dicha adhesión es mediada por un mecanismo receptor y ligando. Normalmente las células del peritoneo sano producen moléculas de adhesión celular, siendo las más importantes VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1.

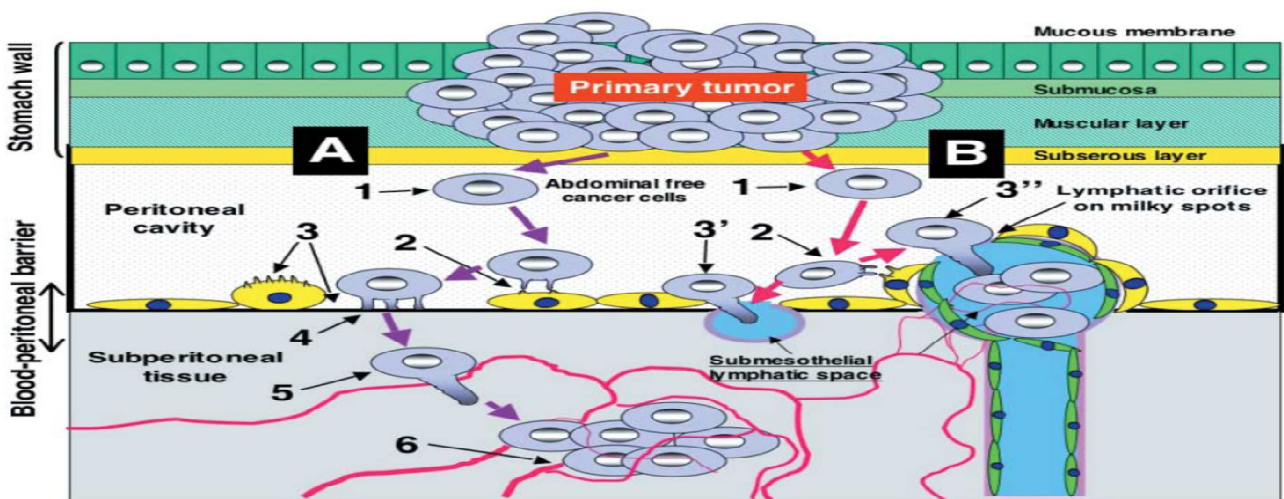
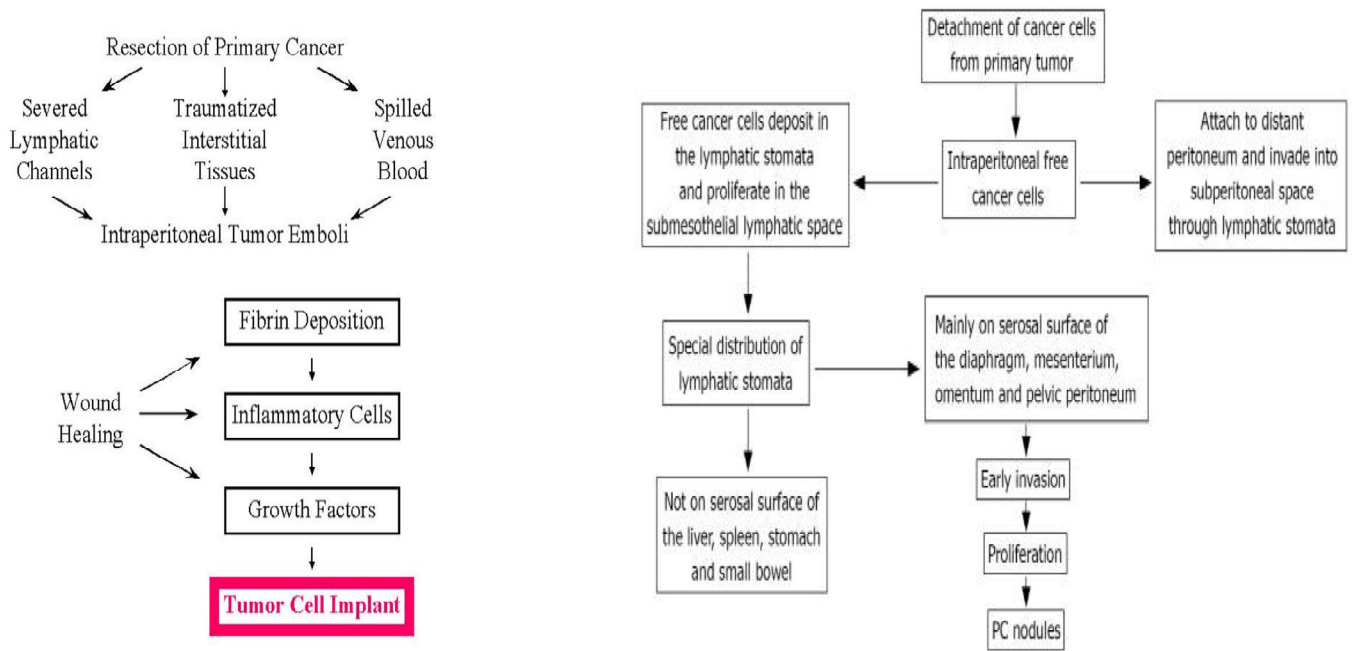
En zonas desnudas de células mesoteliales y/o de mesotelio contraído, la adhesión se hace principalmente a través de la subunidad Beta 1 integrina. Las células tumorales tienen capacidad invasiva a través de la disrupción de las uniones intercelulares, en respuesta a mediadores inflamatorios (Hepatocyte Growth factor/HGF, scatter factor/SF), a través de los mecanismos de degradación de la matriz extracelular mediante metaloproteasas (MMP-7 en la de origen gástrico y la MMP-9 en la carcinomatosis de origen ovárico). Además también es conocido que las células tumorales metastásicas tienen capacidad de inducir apoptosis de células mesoteliales y así penetrar en el espacio submesotelial. Esta propiedad fue estudiada por Heath y

colaboradores, en un estudio in Vitro sobre la célula colorrectal SW80 sobre células mesoteliales (16).

¿Qué ocurre en el epiplón mayor? Es un tejido graso, con inserciones a nivel del bazo, estómago y colon. Su superficie varía desde los 300 cm<sup>2</sup> a los 500, y sus dimensiones desde los 14 a los 36 cm de longitud y entre los 20 – 40 cm de ancho. Además de ser capaz de contener infecciones y perforaciones de vísceras huecas, tiene propiedades cicatrizantes, lo cual es útil en algunos procedimientos reconstructivos. Sin embargo su alta capacidad angiogénica lo hace lábil a la implantación y desarrollo de células tumorales, cuya traducción clínica es la formación del omento tumor o “omental cake” (18).

Ranvier en 1874 fue el primero en describir agregados inmunes en el omento mayor de conejos, lo que llamó “Milky spots”. Estos conglomerados celulares han sido descritos en otros mamíferos incluido el ser humano (19).

Estos “Milky Spots” son conglomerados de leucocitos, que se encuentran incluidos en el tejido omental. Estas estructuras son considerados órganos linfoides secundarios, los cuales contienen macrófagos, linfocitos B, y pocos linfocitos T, pero carecen de células dendríticas interdigitantes y foliculares y tienen pobre respuesta inmune dependiente de células T, con una estructura diferente a los órganos linfáticos convencionales. En estos conglomerados se coleccionan partículas y células de la cavidad peritoneal sean sanas ó tumorales. (20, 21)



(Figura 3: Mecanismos de implantación peritoneal)

La avidéz de las células tumorales por el epiplón mayor se podría explicar por la presencia de una alta concentración de vasos y por el atrapamiento celular a dicho nivel. Hagiwara et al, estudiaron en animales de experimentación la presencia de los “Milky Spots” en epiplón mayor y en el tejido peritoneal extraomental como sería el peritoneo pélvico, zonas de mayor implantación tumoral (22).

La concentración vascular alrededor de los “Milky Spots” es cuatro veces mayor que sobre el resto del omento. Esta gran densidad vascular esta mediada por la liberación de factores pro-angiogénicos (VEGF-A) desde células mesoteliales hipóxicas atrapadas también en estos complejos inmunes (23).

## **1.4 CARCINOMATOSIS PERITONEAL**

### **1.4.1 DEFINICIÓN**

La Carcinomatosis Peritoneal (CP) se define como el crecimiento de tejido neoplásico en el peritoneo, ya sea de origen primario en el propio peritoneo como ocurre con mesoteliomas, adenocarcinomas primarios peritoneales o, por otro lado, secundarios a la diseminación de tumores de etiología digestiva, ginecológica ó por invasión de sarcomas.

En 1931 Sampson, acuñó el término de CP para referirse a la diseminación regional observada en una paciente diagnosticada de cáncer de ovario (24).

Hoy día la definimos como una forma de diseminación locorregional intraabdominal secundaria a cánceres gastrointestinales, ginecológicos y otros tumores, con o sin evidencia de enfermedad metastásica, o bien tumores primarios del propio peritoneo (mesoteliomas o adenocarcinomas primarios del peritoneo). Su manifestación morfológica abarcaría desde pequeños nódulos tumorales subcentimétricos, hasta grandes cavidades abdominales ocupadas por depósitos de tejido tumoral (25).

En la clasificación TNM de la NCCN de 2015 se considera como M1b, es decir, un estadio IVb de la enfermedad.

#### **1.4.2. DISEMINACIÓN**

La implantación metastásica peritoneal se inicia con la aparición de células tumorales libres en la cavidad abdominal, ya sea secundaria a descamación espontánea ó iatrogénica como consecuencia de tumores que invaden serosa, o por la propia desdiferenciación y malignización de las células mesoteliales peritoneales (12).

Dichas células pueden aparecer en esta cavidad de 2 formas distintas, ya sea bien de forma esporádica o de forma iatrogénica.

- 1) la diseminación esporádica peritoneal se debe al desprendimiento de células tumorales del tumor primario libres en cavidad, y desde aquí asientan en el peritoneo sano. Para ello depende de varios factores como serían:
  - un aumento de presión intersticial debido a una alta proliferación celular junto con una ausencia de drenaje linfático.
  - Descenso en la producción de proteínas de adhesión celular, especialmente la E-Cadherina
  - Invasión por parte del propio tumor que sobrepasaría la pared serosa
  - Perforación espontánea del tumor primario, vertiendo dichas células al interior de la cavidad (26, 27).



2) Los mecanismos iatrogénicos son aquellos procedimientos invasivos, quirúrgicos o no, empleados tradicionalmente para el estudio o tratamiento de un tumor localizado en la cavidad peritoneal, independientemente de su origen, que pueden promover la diseminación celular tumoral y/o acelerar el crecimiento tumoral de la enfermedad residual microscópica (28).

La diseminación iatrogénica es secundaria a dichos procedimientos invasivos, que pueden ir desde una punción percutánea hasta resecciones quirúrgicas, ya sea mediante abordaje laparoscópico o tras laparotomía, donde ocurre una ruptura inadvertida del tumor con la consiguiente diseminación celular (29). Diversos estudios han demostrado como puede ver favorecido por el uso de gasas traumáticas, y por el polvo que se desprende de los guantes quirúrgicos (30, 31).

La respuesta inflamatoria del stress quirúrgico, tanto de una forma local como sistémica favorece el implante de dichas células tumorales y su posterior desarrollo.

Dicha diseminación, no sólo tras la manipulación, sino también tras la ruptura espontánea del tumor, no se produce de forma aleatoria, sino que sigue un patrón concreto y predecible. Dicho patrón fue descrito por Carmignani et al (32), el cual describió que se basaba en el movimiento de circulación intraperitoneal del líquido ascítico, el cual presentaría cierto tropismo por los espacios subfrénicos y las zonas de reabsorción del mismo. Zonas más

móviles como la capa serosa del intestino delgado, presentan una menor incidencia de implantación.

### **1.4.3. DIAGNÓSTICO DE CP.**

La CP es difícil de diagnosticar. La elección de pacientes afectados de CP, candidatos a un procedimiento de CRS+HIPEC, está basada en la localización topográfica de la enfermedad y en la extensión aproximada de la misma, basándonos en pruebas de imagen como la Tomografía Computerizada (TAC) y la Tomografía por emisión de positrones (PET). Los marcadores tumorales y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) aunque de utilidad limitada y discutida (la RMN tiene una sensibilidad del 0% para la detección de implantes en el intestino delgado), también tienen su lugar en el diagnóstico de la CP

En casos de fuerte sospecha de enfermedad extensa, enfermedad miliar, o sospecha de enfermedad no visible en las pruebas de imagen habituales, la laparoscopia diagnóstica o de estadiaje, puede ser de gran utilidad (29).

#### **1.4.3.1. TAC:**

A día de hoy es el método diagnóstico de elección dada su rentabilidad diagnóstica. Ahora bien, la cuantificación con precisión de la CP es directamente proporcional al tamaño de dichos implantes y a la localización de los mismos, de tal forma que lesiones menores de 1 cm y localizadas en zonas de compleja visualización tales como mesenterio, hacen que sean más difíciles de detectar (baja sensibilidad). En términos generales la TAC, presenta una

mayor rentabilidad diagnóstica para las metástasis en órganos sólidos ó en el sistema linfático que para la detección de nódulos peritoneales (34, 35).

La sensibilidad de la TAC para diagnosticar CP, varía según las series entre el 60 y el 93%, dependiendo del tamaño de los nódulos, las regiones abdominopélvicas exploradas y la experiencia del radiólogo. En resumen para nódulos mayores de 5cm la sensibilidad es de entre un 60 y un 90% y para menos de 1cm de entre un 10 y un 30% , mayor en zonas como el epigastrio, epiplón mayor y peritoneo diafragmático (60 - 90%), mientras que en otras regiones disminuye, como retroperitoneo y pelvis (50 - 70%) (36,37,38).

La mayoría de los implantes se ven como nódulos sólidos, aunque un engrosamiento difuso o segmentario del peritoneo o una hiperdensidad del peritoneo parietal y distorsiones anatómicas también pueden ser indicadores de CP (39).

Aparte de una finalidad diagnóstica, la TAC tiene otro objetivo, el de cuantificar y mostrar la distribución de la CP, contribuyendo a la selección de pacientes con enfermedad potencialmente resecable, al evaluar áreas claves como la raíz del mesenterio, la superficie serosa del intestino delgado o el territorio periportal. Quizás una de las mayores aportaciones en cuanto a la valoración radiológica preoperatoria mediante TAC fue comunicada por Yan et al (40), así pacientes con mesotelioma peritoneal, fueron divididos en 3 niveles de afectación en función de los hallazgos en la TAC preoperatoria y haciendo referencia a la presencia o no de ascitis, la afectación del intestino delgado y la afectación de la arquitectura topográfica de los vasos mesentéricos.

Estableciéndose los siguientes tipos (Tabla 1):

TIPO	ASCITIS	INTESTINO DELGADO MESENTERIO	VASOS MESENTÉRICOS
0	NO	NO	NORMALES
I	SI	NO	NORMALES
II	SI	ENGROSAMIENTO	NORMALES
III	SI	ENGROSAMIENTO NODULAR OBSTRUCCIÓN SEGMENTARIA	PERDIDA ARQUITECTURA

Tabla 1: Clasificación Radiológica según TAC. Yan et al, Ref.40)

#### 1.4.3.2. PET

La tomografía por emisión de positrones (PET), es una técnica no invasiva de diagnóstico “in vivo” mediante imagen, la cual es capaz de medir la actividad metabólica del cuerpo humano. Al igual que el resto de técnicas diagnósticas en medicina nuclear, la PET se basa en la detección y el análisis de la distribución tridimensional que adopta en el interior del cuerpo un radiofármaco de vida media ultracorta, el cual se administra de forma intravenosa. Existen varios fármacos utilizados para dicho propósito, tales como el 18 Flúor el que puede unirse a la 2-O- trifluorometilsulfonil manosa para obtener como trazador el 18 Flúor-Desoxi-Glucosa (18-FDG). El valor de captación estandarizado - SUV (Standardized Uptake Value) de una determinada región, determina la intensidad de captación y el consumo de glucosa en dicha área. Esto constituye un arma de capital importancia al diagnóstico médico, puesto que la PET muestra qué áreas del cuerpo tienen un metabolismo glucídico elevado, característica esencial de los tejidos neoplásicos.

La utilidad de cara a la identificación de tejidos neoplásicos radica en el hecho de que en el interior de las células neoplásicas el metabolismo es fundamentalmente anaeróbico, lo que incrementa la expresión de moléculas transportadoras de glucosa (de GLUT-1 hasta GLUT-9), aumenta la hexokinasa y disminuye la glucosa 6-fosfatasa. La molécula de 18-FDG es captada con avidéz pero no puede metabolizarse, por lo cual se obtienen imágenes de captación.

Esta técnica por si sola presenta una sensibilidad del 97% para la detección de metástasis de cáncer colorrectal, aunque presenta una baja especificidad, principalmente por el acúmulo de dicho trazador a nivel de estómago, intestino delgado y tracto urinario (41). Otra limitación es que la TAC se realiza en inspiración mientras que el PET se realiza con movimientos respiratorios normales, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de valorar zonas como diafragmas bases pulmonares y superficie hepática en su vertiente diafragmática. Además su captación es baja en pacientes que hayan sido sometidos a quimioterapia sistémica y en tumores donde predomine el material mucoide. Presenta también dificultades para detectar nódulos de carcinomatosis menores a 1 cm, lo que no descarta la enfermedad aunque no se detecte (42).

#### 1.4.3.3. LAPAROSCOPIA EXPLORADORA

En la evaluación de los pacientes candidatos a citorreducción, las técnicas preoperatorias no invasivas (TAC, RNM, PET) tienden a la infraestadificación de la CP en torno al 50% (43, 44). La visualización directa

de la enfermedad puede ayudar en determinados casos. Así, se podría reducir el número de procedimientos fallidos, optimizando el uso de los recursos disponibles (45).

Respecto a la valoración mediante laparoscopia del grado de extensión peritoneal, ésta se puede realizar en la mayoría de las pacientes seleccionadas sin morbilidad asociada (46-49), permitiendo obviar una laparotomía innecesaria en aquellos casos aparentemente resecables o especialmente aquellos en los que existen dudas en las pruebas de imagen preoperatorios, si bien, en ciertos casos, las cirugías previas pueden dificultar ó impedir dicho abordaje.

Esta técnica nos permite, de una forma directa, evaluar la presencia o no de enfermedad maligna peritoneal, y en caso afirmativo, cuantificar de una forma aproximada la extensión de la misma, además de presentar la ventaja de poder tomar biopsias y así confirmar y caracterizar la naturaleza de dicha lesión, y también determina el grado de compromiso del intestino delgado y del mesenterio, ambos considerados factores limitantes en la citorreducción óptima. Si la comparásemos con la laparotomía, la morbilidad de esta es mayor, por lo que los beneficios exploratorios son menores en comparación.

A la hora de la colocación de los trócares, estos deben de situarse en la línea media, debiendo reseca toda la cicatriz por completo en una potencial CRS+HIPEC. Además al realizarse dicho abordaje laparoscópico, el dolor postoperatorio es menor, y la recuperación es más rápida. (50, 51)

Como principales desventajas presenta, que el acceso es limitado para algunas zonas anatómicas. Además presenta una difícil valoración de adenopatías regionales.

Pomel et al (46), comunicaron una serie de 11 pacientes afectados de CP de diferentes etiologías, los cuales eran candidatos a CRS+HIPEC, y previamente sometidos a laparoscopia diagnóstica. Durante ésta, tres enfermos fueron clasificados como irresecables, con una correlación entre los hallazgos laparoscópicos y laparotómicos de un 87,5%.



Figura 4. Laparoscopia diagnóstica. Ascitis e implantes peritoneales.

#### 1.4.3.4.MARCADORES TUMORALES

A día de hoy, se sigue debatiendo su fiabilidad para el diagnóstico y seguimiento de los tumores gastrointestinales y ginecológicos.

#### CEA y Ca. 19.9

El antígeno carcinoembrionario (CEA) fue descrito en 1965 y en la actualidad es un marcador de rutina en la evaluación del cáncer colorrectal metastásico (52). Los valores de CEA confieren una alta sensibilidad y

especificidad al diagnóstico, además de presentar un valor pronóstico de dicha enfermedad, considerando que niveles elevados se corresponden con un peor pronóstico, al igual que la normalización de los niveles de CEA tras una quimioterapia sistémica o cirugía de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal se relacionan con eficacia del tratamiento aplicado (53, 54).

El marcador Ca 19.9 es un antígeno tumoral reconocido por el anticuerpo monoclonal 116NS-19.9. El uso del Ca. 19.9 se utiliza de rutina en el manejo de neoplasias biliopancreáticas, y también se expresa por tumores de estirpe mucinosa como el carcinoma colorrectal y el carcinoma mucinoso de ovario. Pero su baja sensibilidad lo hacen una herramienta diagnóstica insuficiente, ya que determinadas enfermedades benignas, así como defectos del metabolismo pueden elevar los niveles de dicho marcador. En cáncer colorrectal, presenta una menor sensibilidad, aunque una mayor especificidad, especialmente en estadios avanzados, donde se considera factor de mal pronóstico independiente (56).

Otros marcadores como el Ca 125 o 15,3, tienen poca utilidad para el cáncer colorrectal.

#### **1.4.4. ESTADIFICACIÓN DEL GRADO DE CP**

La cuantificación del grado de CP es un indicador pronóstico de la misma. Entre los principales requisitos de un sistema de cuantificación, se encuentra que sea reproducible en una población de pacientes definidos y que sea fácil de utilizar. Actualmente y de forma resumida, existen cuatro sistemas de



estadificación, que serían, el índice de carcinomatosis peritoneal (PCI), el sistema de estadificación de Lyon, la clasificación simplificada del índice de carcinomatosis peritoneal del grupo holandés (SCPI) y la clasificación de la sociedad japonesa de investigación de la carcinomatosis de cáncer gástrico (JRSGS)

#### 1.4.4.1 Índice carcinomatosis peritoneal de Sugarbaker (PCI)

Es el más utilizado por los grandes grupos de CP. Propuesto por Jacques y Paul Sugarbaker (57), supone una forma de evaluación cuantitativa del grado de extensión de la enfermedad. Su cálculo depende de dos factores: La distribución tumoral en las diferentes regiones de la cavidad abdominopélvica y del tamaño de dichas lesiones.

Para llevar a cabo el cálculo del PCI, la cavidad peritoneal se divide en 13 regiones anatómicas (Figura 5). Para cuantificar el tamaño de dichas lesiones, hemos de tener cuenta el diámetro máximo de dichas lesiones. Cuando una región se encuentra afectada por más de un implante, se mide el diámetro de la mayor y se cuantifica. De esta evaluación se excluyen los tumores primarios o recidivas localizadas en el lecho quirúrgico del tumor original. El tamaño de los implantes se clasifica en 4 tipos, que abarcan desde LS-0 a LS-3. LS-0 significa que no hay implantes, LS-1 que su tamaño es menor de 0,5 cm, LS-2 indica que el tamaño de los nódulos está comprendido entre 0,5 y 5 cm, y ya por último LS-3 indica que los nódulos son mayores de 5cm ó que existen varios de ellos confluyendo en el mismo área.

Este índice de clasificación tiene un importante valor pronóstico y terapéutico, tal como indicó Elías et al (58). Así la supervivencia fue significativamente mejor cuando el PCI fue inferior a 16 en pacientes intervenidos por CP de origen colorrectal. Sugarbaker comunicó en una serie de 100 pacientes con carcinomatosis de origen colorrectal, que la tasa de supervivencia a los 5 años era del 50% cuando el PCI era menor de 10, del 20% cuando dicho PCI oscilaba entre 11-20 y una supervivencia de 0% cuando era mayor de 20 (59, 60).

## Peritoneal Cancer Index

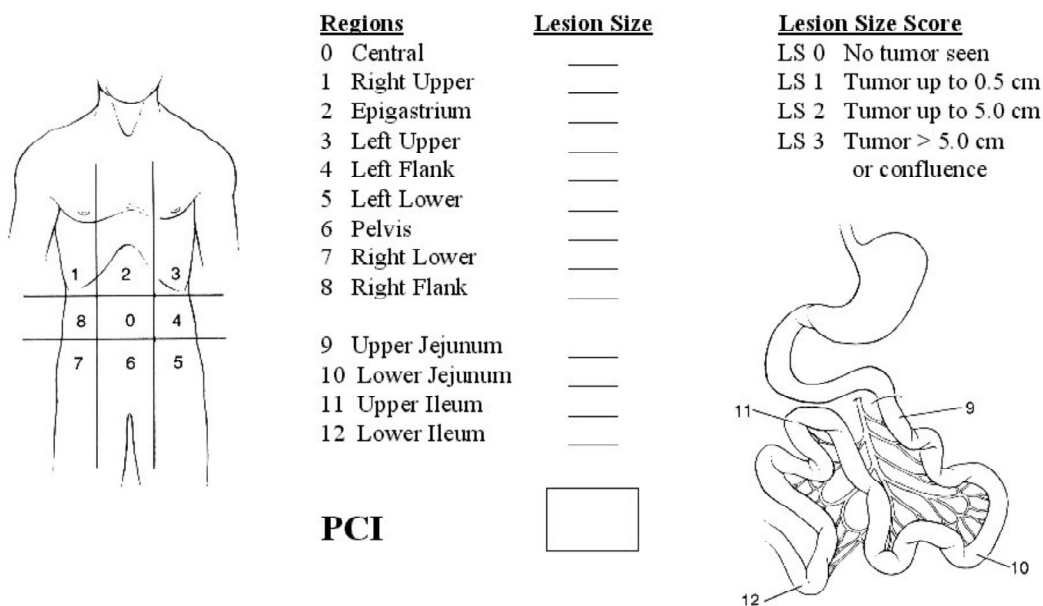


Figura 5: Peritoneal Cancer Index (PCI). Adaptación Sugarbaker et al. Ref.51

### 1.4.4.2. Sistema de estadificación de Lyon

Descrito por primera vez por Gilly en 1994, para el cual tiene en cuenta el tamaño de los implantes tumorales (<5mm , 5mm a 2 cm, >

2cm) y su distribución (localizada o difusa) dividiendo de esta forma la extensión en cuatro estadios (61).

ESTADIO	DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD PERITONEAL
0	No enfermedad macroscópica
1	Enfermedad <0.5 cm en una región abdominal
2	Enfermedad <0.5 cm con distribución difusa en el abdomen
3	Enfermedad entre 0.5-2 cm
4	Enfermedad >2 cm

Tabla 2: Estadificación de Lyon. Adaptación Gilly. Ref. 54

#### 1.4.4.3. PCI Simplificado del Grupo Holandés (SCPI)

El instituto del cáncer holandés (62), clasifica en función de tamaño de los implantes, dividiéndolos en grandes: mayores de 5cm, medianos: aquellos comprendidos entre 1-5cm ó pequeños: menores de 1 cm. La distribución tumoral se realiza de acuerdo con la presencia en siete áreas: Región subdiafragmática derecha, izquierda, subhepática, epiplón y colon transversal, intestino delgado y su mesenterio, región ileocecal, región pélvica,

#### 1.4.4.4. Clasificación de la Japanese Research Society for Gastric Carcinomatosis Staging (JRSGS)

No aplicable al cáncer colorrectal, sólo se reseña aquí para su conocimiento.

## **1.5 TRATAMIENTO MULTIDISCIPLINAR**

El planteamiento y desarrollo del tratamiento multidisciplinar de la CP, consistente en cirugía radical completa más quimioterapia intraperitoneal modulada con hipertermia (CRS+HIPEC) o no, está relacionado con los conocimientos descritos sobre la fisiopatología del peritoneo y los mecanismos que permiten la implantación y el crecimiento de las células tumorales en la cavidad peritoneal (63, 64).

Tras el cambio en la concepción de la enfermedad definido por Sugarbaker, como enfermedad locorregional y no enfermedad sistémica, éste propuso un tratamiento de intensificación terapéutica regional, basado en una cirugía radical que eliminara todo el tumor macroscópico existente en la cavidad abdominal, seguido de la administración inmediata de quimioterapia intraperitoneal, asociada o no al uso de hipertermia (CRS+HIPEC), la cual actuaría eliminando el residuo tumoral mínimo o microscópico, y que sería la causa de nuevas recidivas y de la implantación.

Estas tres actuaciones diferentes, pero de aplicación conjunta, permiten obtener beneficios cuando se emplean de forma estricta, ordenada y completa, en un grupo seleccionado de pacientes (65).

### **1.5.1 SELECCIÓN DE PACIENTES**

La indicación del tratamiento multidisciplinar de la CP, debe de partir de una selección estricta de los pacientes, dado que los mayores

índices de supervivencia descritos corresponden con aquellos pacientes en los que se consigue realizar una citorreducción completa. La citorreducción incompleta se asocia con una menor supervivencia media, riesgos elevados para el paciente y una importante carga económica para el sistema sanitario. La distribución y la extensión son los determinantes principales para poder llevar a cabo una completa citorreducción, para lo que nos valemos de todo el arsenal diagnóstico descrito previamente (66).

Este tratamiento multidisciplinar muestra unos datos de supervivencia significativamente superiores a los tratamientos paliativos tradicionales, pero sin presentar una nada desdeñable morbimortalidad, por lo que una adecuada selección de pacientes es importante para establecer las indicaciones del tratamiento y obtener el máximo beneficio clínico (67).

Existen una serie de parámetros, que se han asociado con la posibilidad de llevar a cabo una completa citorreducción, con una menor morbimortalidad y una mayor supervivencia, siendo:

- Performance status (Eastern Cooperative Oncology Group):  $\leq 2$
- Ausencia de enfermedad tumoral extraabdominal (aspecto fundamental)
- Menos de tres lesiones hepáticas que sean técnicamente resecables
- Ausencia de obstrucción biliar

- Ausencia de obstrucción ureteral
- Obstrucción intestinal única
- Ausencia de afectación intensa del intestino delgado, entendida como no enfermedad voluminosa o retráctil del mesenterio y no afectación serosa intestinal masiva, u obstrucción multisegmentaria
- Enfermedad poco voluminosa en el ligamento gastrohepático.

a) Los criterios de inclusión para llevar a cabo un tratamiento multidisciplinar, aunque pueden variar en función de la estirpe tumoral, son los siguientes:

- Edad inferior a 70 años. Pacientes de mayor edad, con enfermedad localizada y buen estado general podrán ser valorados.
- Pacientes con CP considerada resecable según datos clínicos y paraclínicos.
- Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group):  $\leq 2$
- Ausencia de Insuficiencia cardiorrespiratoria, renal o hepática
- Realizarse al menos un mes después de la administración de último ciclo de quimioterapia sistémica.
- Consentimiento informado específico.

b) Siendo criterios de exclusión:

- CP de origen mamario, biliar, pancreático ó broncopulmonar.
- CP valorada como irresecable.
- Enfermedad extraabdominal.

- Imposibilidad de un adecuado seguimiento
- Presencia de otra lesión tumoral sincrónica
- Obstrucción intestinal multisegmentaria
- No aceptación del consentimiento informado.

## **1.5.2. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO**

### 1.5.2.1. CITORREDUCCIÓN (CRS)

La citorreducción consiste en la eliminación de la máxima masa tumoral, que asienta sobre la superficie peritoneal y sobre vísceras abdominales, para ello se llevan a cabo peritonectomías, resecciones viscerales y electrofulguración, cuyo objetivo es eliminar la enfermedad macroscópica, la enfermedad visible (68,69).

El tratamiento de la CP puede ser realizado con intención curativa ó con el propósito de ofrecer una mayor supervivencia a dichos pacientes, asociando una morbilidad comparable con otros procedimientos quirúrgicos de alta complejidad (63).

A día de hoy, el factor pronóstico más importante es conseguir una citorreducción completa. Esta también se justifica porque la capacidad de penetración de los quimioterápicos es de sólo 1 o 2 mm de profundidad, y que su objetivo es destruir el residuo microscópico residual.

Existen varias definiciones para citorreducción completa, en relación al tamaño tumoral. Durante la 5º Reunión Internacional de Consenso sobre el Tratamiento de la Enfermedad Peritoneal Maligna, celebrada en Milán, Italia en Diciembre de 2006, se consideró que la Clasificación recomendada para dicha estratificación era la de Sugarbaker ("CC Score") donde se considera una citorreducción completa aquella cuyo residuo tumoral es menor de 0,25cm (CC0-CC1) siendo este un escenario adecuado para llevar la aplicación de la quimioterapia intraperitoneal y así favorecer la penetración del mismo. Residuos mayores de 2,5cm se consideran insuficientes, cuestionando así el aporte de la quimioterapia, aunque existe un beneficio en cuanto a la supervivencia cuando se compara con otras estrategias paliativas (70).

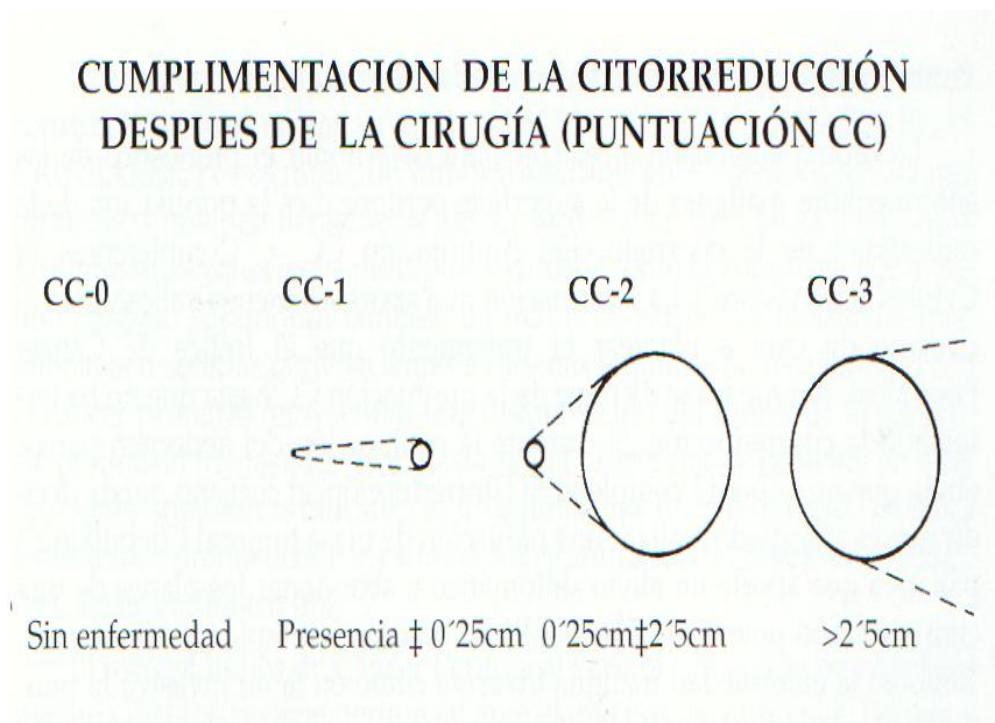


Figura 6: Clasificación del Grado de Citorreducción. Adaptación de González Moreno et al. Ref. 70.



La Citorreducción consta de dos fases:

1) Citorreducción Quirúrgica:

La realización de cirugías extensas empleando técnicas de peritonectomías y resecciones multiviscerales, está bien definida en lo que a técnicas quirúrgicas se refiere. El objetivo es la realización de una resección macroscópica completa, o al menos lo más aproximada posible, de la enfermedad difusa, aún cuando esta pueda ser muy voluminosa y dispersa, siguiendo las indicaciones descritas por Sugarbaker.

a) Posición del paciente e incisión quirúrgica.

El paciente es colocado en posición decúbito supino permitiendo el acceso completo al periné durante el procedimiento quirúrgico. La posición debe ser vigilada por el cirujano que va a llevar la intervención, además debe proteger todas las zonas acras de problemas derivados de un decúbito prolongado, para ello se puede valer de elementos acolchados. Además es muy útil el empleo de sistemas de compresión venosa en miembros inferiores como profilaxis de la enfermedad tromboembólica. Se pueden emplear también medidas físicas como mantas de calor o refrigerables para ayudar a mantener la homeostasis térmica durante cada una de las fases del procedimientos.

La vía de acceso debe ser amplia, recomendando una laparotomía media extensa desde apéndice xifoides hasta pubis.

### b) Peritonectomía Pélvica

El peritoneo se desinserta de la superficie posterior de la incisión abdominal inferior, dejando al descubierto el músculo recto anterior desde el ombligo. En el extremo inferior de la laparotomía, el peritoneo se separará de la vejiga de la orina, tras seccionar los restos del Uraco, los cuales pueden servir como referencia y para traccionar del mismo. Llevar a cabo un llenado intermitente de la vejiga puede ayudar al cirujano a la realización de la peritonectomía vesical.

En la mujer, lateralmente encontraremos los ligamentos redondos. Continuando de forma lateral hacia el retroperitoneo encontraremos los vasos ilíacos , el uréter. Si esta indicada la resección del rectosigma, se selecciona el punto de corte, se lleva a cabo la preparación del mesorrecto y se procede a ello. Tras la sección de la pieza se procede a completar la pelviperitonectomía. La reconstrucción del tránsito se realiza según los principios de cualquier anastomosis digestiva.

### c) Resecciones del tracto urinario

Si fuera necesario llevar a cabo la resección del uréter, el posterior restablecimiento del tránsito urinario dependerá de varios factores, tales como son el grado funcional de ambos riñones, zona de compromiso del uréter, características del uréter contralateral y el grado de afectación de la vejiga.

Como en todas estas lesiones, debe de primar el conseguir una citorreducción completa de las lesiones patológicas, preservando la vascularización de dicho uréter, manteniendo un drenaje correcto, y pudiendo llevar a cabo una anastomosis muco-mucosa libre de tensión entre los cabos libres de enfermedad.

Cuando la lesión ureteral se encuentra debajo del cruce del uréter con la arteria ilíaca común, existen muchas alternativas para la resolución de la continuidad del flujo urinario. En general se debe intentar anastomosis término-terminal. A menudo, a consecuencia de las posibles estenosis, se prefiere realizar un reimplante ureteral a vejiga, para ello se realiza una vejiga psoica (psoas hitch) si el cabo del uréter se encuentra por debajo del cruce. Si por el contrario se encuentra por encima de dicho cruce, se emplearía un colgajo de vejiga (Boari). Si la lesión se presenta en tercio medio o superior, si el defecto es pequeño pueden repararse mediante ureterostomía término-terminal espatulada, y en caso de pérdidas mayores de uréter se pueden realizar otras acciones como movilizar el riñón, transureterostomía, autotransplante, o la interposición de intestino delgado. Después de la realización de dichos procedimientos es necesario utilizar un catéter en "doble J". La opción de la transureterostomía o cruce ureteral obra además especial importancia en lesiones altas con radioterapia pélvica previa, así como la interposición de un asa de intestino delgado es preferible en pacientes en los que además

del uréter se asocie una resección extensa de la vejiga, o existe riesgo de una vejiga de poca capacidad debido al volumen resecado

d) Omentectomía Mayor con o sin esplenectomía y exploración del estómago.

La omentectomía aparte de ser un gesto quirúrgico habitual, permite liberar la mitad anterior del abdomen para permitir el acceso al resto de la cavidad peritoneal.

El epiplón mayor se levanta y se separa del colon transversal. De esta forma queda expuesto el mesocolon transversal y la cara anterior del páncreas. La arcada gastroepiploica es ligada sistemáticamente mediante disección y ligadura o con instrumentos sellantes hemostáticos. La omentectomía es total, llegando hasta los vasos cortos gástricos.

Si se precisa una esplenectomía, esta puede realizarse en bloque junto con el omento mayor. Si dicho epiplón presenta implantes que afectan al colon transversal, este deberá ser resecado junto a él.

e) Hilio hepático-omentectomía menor.

Se procede a realizar la colecistectomía identificando los elementos aferentes a la misma. Se procede con la disección del peritoneo del pedículo portal, con cuidado de no lesionar ninguna estructura vasculobiliar. Tras realizar la desinserción del epiplón

menor se aprecia como aparece el lóbulo caudado. La existencia de una arteria hepática izquierda proveniente de la coronaria-estomáquica, que cruce el omento menor, debe respetarse.

#### f) Intestino delgado

La característica histológicas y profundidad de la invasión los implantes peritoneales dependen del tumor original, de su agresividad y de su histología. En función de la extensión de la invasión, el tamaño del nódulo tumoral y su localización anatómica, se pueden subdividir en cinco tipos.

-Tipo 1: Nódulos no invasivos, de pequeño tamaño que no afectan más profundo de la serosa. Es posible su resección mediante tijera y no suelen precisar de reparación seromuscular.

-Tipo 2: Hablamos de pequeños nódulos invasivos en la región antimesentérica del intestino delgado. Estos nódulos no se separan tan fácilmente y precisan de resecciones de mayor profundidad, pero manteniendo íntegra la mucosa y la submucosa. Estas zonas precisan de refuerzo posterior con puntos.

-Tipo 3: Nódulos de moderado tamaño, invasivos, de localización antimesentérica, los cuales ya si precisan una resección total elíptica de dicha zona.

-Tipo 4: Incluimos todos los tamaños de nódulos invasores tanto en la zona mesentérica como en la porción antimesentérica. Estas lesiones precisan una resección del segmento de intestino delgado aunque permiten conservar el mesenterio de la zona afectada.

-Tipo 5: Grandes nódulos invasores. Estas lesiones precisan de una resección segmentaria con amplios márgenes en la pared del intestino y el mesenterio.

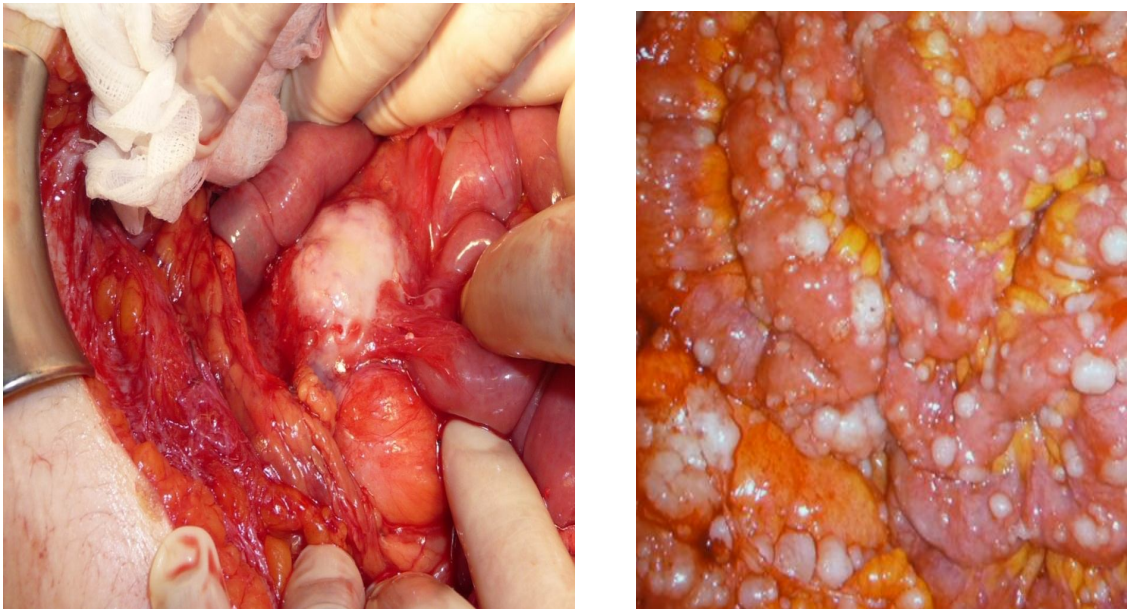


Figura 7: Implantes en Intestino delgado. Único vs Múltiples. C.H. Torrecárdenas.

La afectación del intestino delgado, también está condicionado por los movimientos peristálticos intestinales constantes que impide el asentamiento de las células tumorales sobre la serosa, excepto en zonas donde el mesenterio sea más corto y el asa intestinal se encuentre fije al retroperitoneo, como sería el ángulo de Treitz, íleon distal y válvula ileocecal.

La citorreducción de la zona mesentérica suele ser más sencilla. Los nódulos invasores requieren a veces de la resección de una pastilla compleja de mesenterio, teniendo precaución de preservar la vascularización de dichos segmentos intestinales. Si dichos implantes fueran de menor tamaño pueden electrofulgurarse con punta de bola cuando aparecen dispersos o mediante exéresis de fragmentos de dicho mesenterio.

Cuando existen afectación masiva de la serosa del intestino delgado, se considera criterio de irreseabilidad y supone una de las limitaciones más importantes para completar dicha cirugía (síndrome de intestino corto).

#### g) Hipocondrio derecho

El peritoneo se separa de la vaina posterior del músculo recto anterior derecho para a partir de aquí comenzar la peritonectomía en el cuadrante superior derecho. Continuamos lateralmente hacia la derecha para encontrar la grasa perirrenal que cubre el riñón derecho. Es frecuente visualizar la glándula suprarrenal derecha. Tener cuidado durante dicha disección de no lesionar las venas suprahepáticas ni la cava retrohepática. Si la lesión infiltra en profundidad, a veces es necesario reseca parte del diafragma. Tras completar la resección diafragmática, se puede proceder con la disección de los implantes en ligamento

falciforme y los que se encuentran apoyados sobre la cápsula de Glisson.

#### h) Hipocondrio izquierdo

Al igual que en lado derecho, hemos de resecar todo el peritoneo parietal para conseguir una erradicación total. Se comienza de nuevo por detrás del músculo recto del abdomen avanzado hacia la cúpula izquierda. Para conseguir una exposición adecuada es necesario movilizar el ángulo esplénico del colon. Se debe movilizar el bazo también, aunque solo se procederá a realizar la esplenectomía si presenta enfermedad.

#### i) Resecciones Gástricas y espacio subpilórico

Las resecciones gástricas en situaciones de CP solo deben realizarse, cuando existe afectación parcial de la pared gástrica por CP de un tumor primario no gástrico (pseudomixoma, cáncer epitelial de ovario, mesotelioma) ó cuando aparece una afectación de un primario gástrico (adenocarcinoma gástrico).

En caso de afectación del estómago lo indicado es realizar una gastrectomía total más linfadenectomía D2, combinado con peritonectomía de las zonas afectas más una reconstrucción en Y roux.

La conducta de la mayoría de grupos es la conservadora, intentando evitar la mayor parte de resecciones gástricas, ya que la gran mayoría de estos enfermos, con gran seguridad llevará



asociada la realización de resecciones de intestino delgado o grueso. En el caso de precisar la realización de una antrectomía , la reconstrucción se realizará anastomosis gastroyeyunal tipo Billroth II, siendo la ventaja que solo se realizará unas anastomosis, pero en contra el vaciamiento gástrico se verá enlentecido. Además las resecciones gástricas tienen asociado el desmedro en el estado nutricional del enfermo, que sumado a las posibles resecciones de intestino delgado, contribuiría al síndrome de intestino corto.

La región subpilórica es una zona de concentración de enfermedad tumoral, debido al drenaje portal, y además es una zona declive en la cavidad peritoneal. La gran mayoría de veces es factible la eliminación de implantes tumorales preservando la pared gástrica y duodenal. Si no fuera posible se trataría de eliminarlos mediante electroevaporación ó realizando resecciones locales de las lesiones y si se precisa sutura posterior del defecto.

## 2) Citorreducción mediante electrofulguración:

Los implantes pequeños o “miliares” o aquellos que aparecen aislados sobre vísceras (cápsula de Glisson, intestino delgado o su mesenterio, pared gástrica, etc..) son electroevaporados o sometidos a ablación mediante electrocauterio a alto voltaje o radiofrecuencia, usando para ello el arsenal terapéutico a nuestra disposición como TissueLink, láser argón, etc...

Se recomienda el uso del electrobisturí, con terminal esférico de 3 mm (tip ball, Valleylab Boulder®), por su capacidad de electrofulgurar con toda la superficie de la esfera en la interfase del tejido sano y el tumoral. Debemos extremar los cuidados en la electroevaporación en vísceras huecas, tales como uréteres, intestino delgado ó colon, por el riesgo de perforación o fistulización.

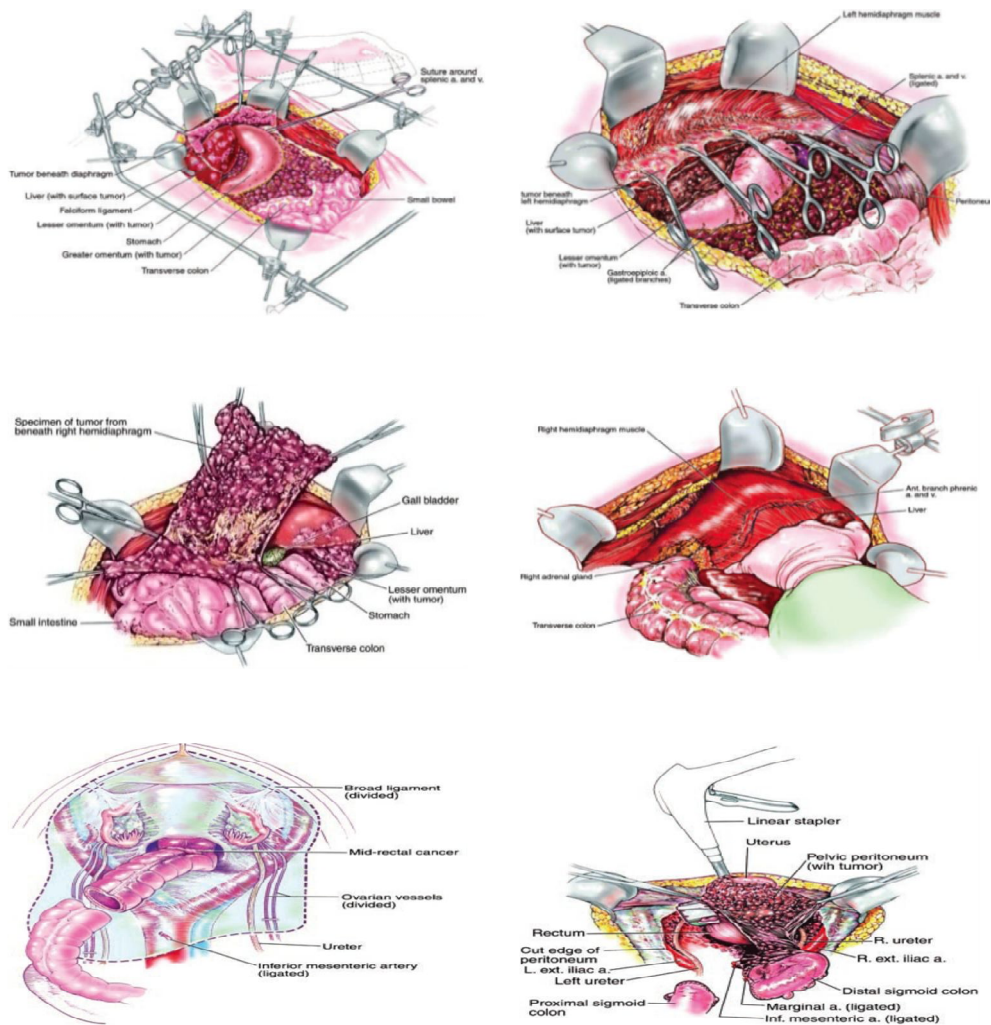


Figura 8: Cirugía de Citorreducción. Adaptación de Sugarbaker et al. Ref. 5

#### 1.5.2.2. QUIMIOTERAPIA INTRAPERITONEAL INTRAOPERATORIA HIPERTÉRMICA (HIPEC)

La quimioterapia de forma regional pretende alcanzar concentraciones altas de un agente citotóxico en tumores localizados en un punto determinado del organismo. Administrada de forma intraperitoneal permite realizar de forma intensiva un tratamiento local.

Los primeros datos de los que se disponen de administración de “fármacos” en el espacio intraperitoneal, datan del S.XVIII (1744) donde Christopher Warrick, cirujano inglés, administro una mezcla de “agua de Bristol” y “Claret” (vino Bourdeaux) dentro de la cavidad peritoneal de una paciente afecta de ascitis refractaria (71).

Tras el descubrimiento del potencial citostático de la Mostaza Nitrogenada, en la segunda guerra mundial, esta comenzó a emplearse para la administración de quimioterapia intraperitoneal. En 1955, el Prof. S.Weisberger, empleó en 11 pacientes mostaza nitrogenada para el tratamiento intracavitario de la carcinomatosis de origen ovárico y sarcomatosis. La eficacia fue limitada y la toxicidad sistémica elevada (72). Posteriormente, otros grupos realizaron intentos aislados de administración intracavitaria, sin citorreducción, de diversas sustancias con oro radiactivo y 5 Fluoracilo (73, 74).

No fue hasta el 24 de Febrero de 1979 cuando se realizó la primera citorreducción extensa con quimioterapia intraoperatoria

hipertérmica por el Dr. John Spratt del Departamento de Cirugía de la Universidad de Louisville, Kentucky, USA. Se trataba de un paciente de 35 años, diagnosticado de pseudomyxoma peritoneal, por cistoadenocarcinoma de páncreas. El paciente, había sido sometido, 2 años antes, a una extracción de moco de la cavidad peritoneal, con toma de biopsias, sin conseguir mejorar los síntomas de aumento de diámetro peritoneal y saciedad precoz.

Este paciente había leído publicaciones previas de John Spratt sobre su experiencia en animales, y solicitó ser el primero en someterse a este nuevo abordaje. Los hallazgos operatorios descritos fueron abundante cantidad de moco, implantes a nivel de colon derecho y transversal y un nódulo a nivel de la cola pancreática. Los gestos quirúrgicos realizados fueron hemicolectomía derecha ampliada, omentectomía, esplenectomía y pancreatectomía distal. La reconstrucción posterior fue una anastomosis ileocólica a nivel de colon descendente. El quimioterápico administrado fue Thiotepa, el cual no es dependiente del ciclo celular, a una temperatura de 42°C durante 90 min. Al 5º día de postoperatorio se administró vía intraperitoneal Metrotrexate, agente ciclo específico. La evolución fue satisfactoria (75). Posterior a esta primera publicación, se sucedieron otras publicaciones, también con estudios experimentales del mismo grupo que consolidaban los resultados previos (76).

Este trabajo de Spratt y de su equipo estaba basado en un primer modelo farmacocinético descrito previamente por Robert Dedrick y el equipo del National Cancer Institute (NCI). En 1978, estos autores describieron el primer modelo farmacocinético para el tratamiento de la CP de origen ovárico, en el que determinaron que con este modelo se podría exponer al tumor a concentraciones del fármaco de hasta 100 veces más que lo que se conseguían con la administración sistémica (77).

En esta época destacan también los trabajos de Koga et al (78), los cuales estudiaron la viabilidad de las células tumorales libres en la cavidad peritoneal, para ello analizaron 100 enfermos afectados de adenocarcinoma gástrico, donde encontraron que dichas células se detectaban en el 48% de los tumores que comprometían la serosa gástrica y así consolidaban la teoría de diseminación transcelómica por descamación celular, además de describir que estas células eran altamente viables y que la administración intraperitoneal de 10 mg de Mitomicina C durante 30 minutos, disminuía significativamente su viabilidad.

El grupo de Speyer en 1980 empleó 5 Fluoracilo y metotrexate en normotermia en pacientes con CP, los cuales no fueron sometidos a citorreducción, y donde se concluyó que la administración normotérmica de dichos citostáticos era segura y que las concentraciones peritoneales

que conseguía el fármaco en la lesión era de 200 a 300 veces mayor que cuando se procedía a la administración sistémica (79).

A la hora de llevar a cabo la elección del fármaco es necesario tener en cuenta su peso molecular, liposolubilidad, permeabilidad capilar, tiempo de eliminación de la circulación sistémica, capacidad de paso al sistema portal y la potenciación de sus efectos con la hipertermia. Siendo muy importante que sean quimioterápicos ciclo-celular no específicos es prioritario a la hora de su utilización intraperitoneal.

El tratamiento con quimioterapia intraoperatoria hipertérmica se realiza una vez ha concluido la citorreducción quirúrgica. La racionalidad de dicho tratamiento se sustenta en la clásica frase propuesta por el Dr. Sugarbaker en 1985 que “lo que mata es lo que el cirujano no ve”, refiriéndonos en este caso a la enfermedad microscópica residual (80, 81).

La solución citostática se administra directamente en la cavidad peritoneal, ya sea con el abdomen abierto ó cerrado, mediante un sistema de recirculación continua. A día de hoy, se acepta que la temperatura ideal es de 42-43 °C. Temperaturas superiores a esta pueden aumentar el riesgo de daño al intestino delgado, y menores reducen su eficacia citotóxica. Por cada grado menos de temperatura alcanzada, la eficacia obtenida por la hipertermia se disminuye en un 50% (82, 83)

La hipertermia aumenta la respuesta del tumor a los citostáticos por varios mecanismos. El primero sería el efecto antitumoral del calor por si mismo. A este respecto, las células tumorales son más sensibles al calor que las células normales. Se considera que una temperatura mayor de 41°C induce citotoxicidad de dichas células. El mecanismo propuesto parece ser la desnaturalización proteica, junto con la inhibición del metabolismo celular, debido a alteraciones en el ADN, lo cual produciría un aumento de la acidez del medio, junto a una activación lisosomal y como conclusión una muerte celular. El otro mecanismo propuesto sería que la hipertermia potencia el efecto citotóxico de algunos quimioterápicos como sería la doxorubicina, mitomicina C, melphalan, docetaxel, irinotecán, gemcitabina y complejos platinos, entre otros.

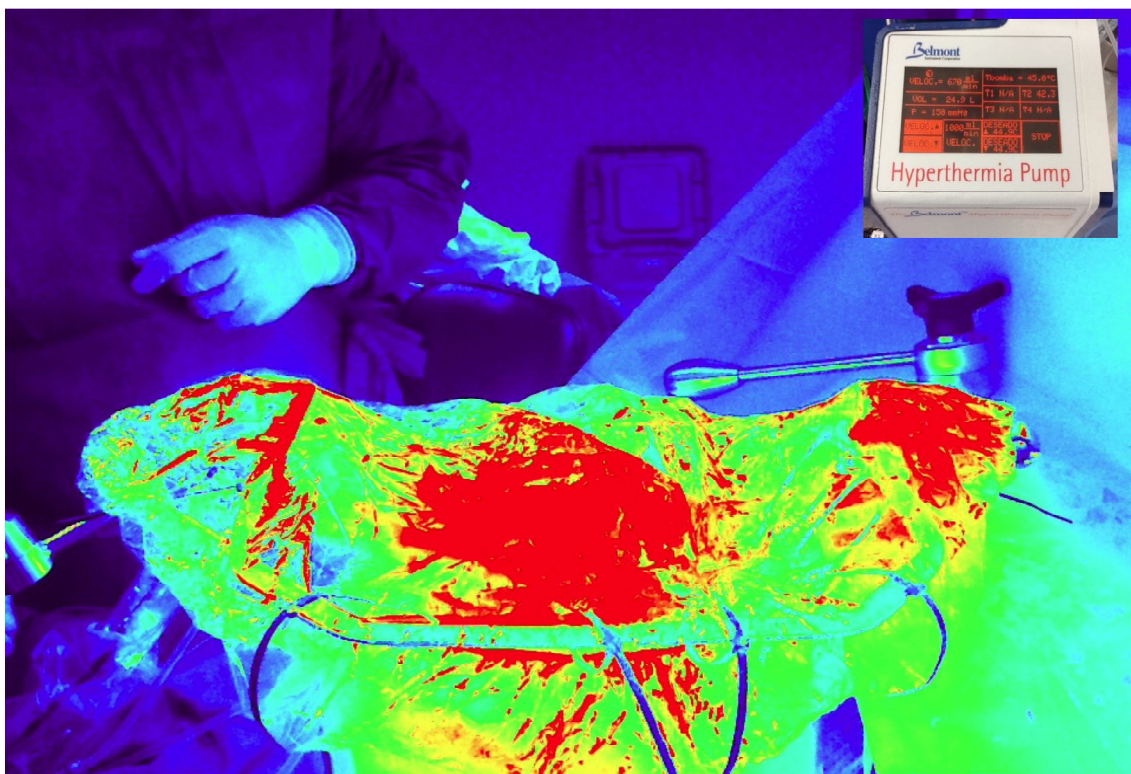


Figura 9: Hipertermia Intraoperatoria. C.H. Torrecárdenas.

Para que la HIPEC sea eficaz debe bañar todas las superficies peritoneales y mantenerse a una temperatura homogénea, lo más cercana a dicha temperatura.

Las tres modalidades que existen actualmente de aplicación de HIPEC son:

a) Técnica Abierta (Técnica del Coliseo):

Propuesta por el Dr. Sugarbaker. Una vez completada la citorreducción, se tracciona de la piel, y mediante una sutura continua, o como en nuestro caso realizamos, con bridas, se eleva dicha piel hacia las barras del separador, generalmente tipo Thompson, generando una cavidad, de forma parecida a un Coliseo, donde se instila la solución del quimioterápico. Se colocan 2 catéteres instiladores (in-flow) y otros 2 aspirados, a través de los cuales se formará el circuito de la quimioterapia. Estos dispositivos van previstos de unos termómetros para el control de la temperatura y que todo se efectúe correctamente. En la actualidad, en el mercado hay una amplia gama de quimioperfusores.

El quimioterápico se instila desde un dispositivo extracorpóreo el cual impulsa el fármaco a través de un sistema de rodillos que pasa a través del calentador alcanzando los 46-48°C y de aquí es introducido en la cavidad abdominal a un flujo de entrada de generalmente 1,6 a 1,8 l / min.



Durante toda la intervención se encuentra en funcionamiento un aspirador de humos que prevenga de la contaminación del aire, en el quirófano, debido al aerosol que se puede formar a consecuencia de la quimioterapia (84). El cirujano mueve continuamente para favorecer la circulación del quimioterápico intraperitonealmente. Las ventajas de esta técnica son el acceso directo a dicha cavidad y controlar de forma directa el exceso de calor. Además permite revisar hemostasia y cualquier posibilidad de fuga. En contraposición se pierde calor y esto puede dificultar el mantenimiento de una temperatura constante, además de existir un mayor riesgo de volatilización del fármaco.

b) Técnica Cerrada:

Al igual que en la técnica previa, una vez realizada la citorreducción, se procede al cierre de la pared abdominal , siempre que se hayan extraído previamente los tubos de instilación de la quimioterapia al exterior. El cierre puede ser temporal , lo que significaría cerrar solo piel, o definitiva, implicando el cierre de aponeurosis. Como ventajas de esta administración, encontramos que al producirse una hiperpresión debido al cierre de dicha cavidad, el quimioterápico penetra con mayor facilidad en los tejidos. Esto se ha demostrado para fármacos como la doxorubicina, el cisplatino y el oxaliplatino a presiones de 20 – 30 mmhg (85, 86) . Además otra ventaja añadida, es que la conservación de una temperatura de 42-43°C

se realiza de una forma más segura y su mantenimiento en el tiempo es más sencillo. Como desventaja nos encontramos que la distribución del fármaco no es uniforme, y puede coleccionarse en diferentes regiones y en otras no llegar a su concentración mínima eficaz además de una mayor toxicidad sistémica por un aumento en la absorción. Respecto a la morbilidad no se ha demostrado diferencias en la bibliografía.

c) Técnica Semiabierta:

Es una técnica abierta modificada, con un sistema de cierre de la cavidad peritoneal, el cual permite el acceso a la misma. Presenta la misma penetración que la técnica abierta (87).

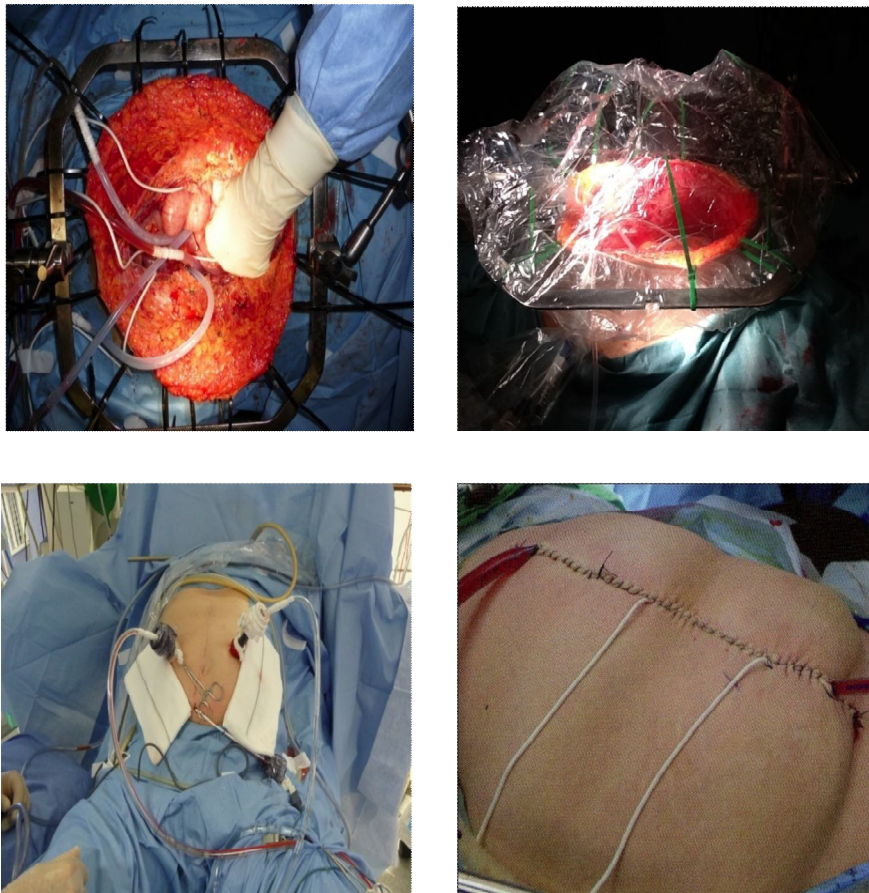


Figura 10: Modalidades de realizar HIPEC. C.H. Torrecárdenas.

Tras la reunión de Milán en 2006, se sigue debatiendo cual es la mejor técnica para realizar la administración de HIPEC. Elías et al (88) demostraron, con la aplicación de un colorante intraperitoneal, que la técnica de abdomen cerrado no distribuía por igual el fármaco, creándose circuitos cerrados donde el quimioterápico circulaba, pero quedaban otras zonas que no eran bañadas por el mismo. Por el contrario, aquellos en los que el abdomen permanecía abierto, si permitían que el fármaco circulase por toda la cavidad impregnando todas las superficies.

Para que se produzca una exposición total de los tejidos al citostático, no solo depende de el mismo, de su hidrosolubilidad y de su peso molecular sino también de la solución transportadora, que debe mantener un volumen constante en el tiempo.

Para dicho fin se han utilizado distintas combinaciones de soluciones transportadoras, ya sean hipotónicas, isotónicas, e hipertónicas, combinándolas con quimioterápicos de bajo y alto peso molecular, con el fin de optimizar el tratamiento intraperitoneal, de forma que este permanezca más tiempo y con mayor exposición en el tejido peritoneal y en las células tumorales, con un mínimo paso a la circulación sistémica, para disminuir así la toxicidad.



Figura 11: Quirófano CRS + HIPEC. C.H. Torrecárdenas.

Las soluciones transportadoras más empleadas son el Cloruro Sodio al 9% , el suero glucosado al 5% y las soluciones de hetastarch o icodextrin.

Teóricamente las soluciones hipotónicas son las que tendrían ventajas sobre las otras, si nos referimos al paso del citostático a los tejidos peritoneales y subperitoneales, sin embargo aún faltan estudios que corroboren dichas teorías.

Recientemente se han introducido catéteres que permiten la difusión del quimioterápico con CO<sub>2</sub>.

A continuación, en la tabla 3 se muestran los fármacos mas empleados para HIPEC.

<i>CITOSTÁTICO</i>	<i>AREA BAJO LA CURVA</i>	<i>SINERGIA CON HIPERTERMIA</i>
MITOMICINA-C	10-23.5	+
CISPLATINO	13-21	+
CARBOPLATINO	18	+
OXALIPLATINO	16	+
PACLITAXEL	>1000	PENDIENTE DE ESTUDIO
DOCETAXEL	552	+
MITOXANTRONE	115	VARIABLE
DOXORRUBICINA	230	+
5-FLUORURACILO	367	-

Tabla 3: Principales fármacos utilizados y sus características farmacocinéticas.

## **1.6. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA (CTCs).**

Como hemos visto hasta ahora, el tratamiento de la CP es un tratamiento complejo, con varias líneas de acción y que precisa de una total conexión entre cirujanos y oncólogos, ya que ellos aportan los nuevos tratamientos sistémicos oncológicos que deben de integrarse en el planteamiento global, de modo que, consiguiendo una adecuada selección del paciente, podamos obtener los mejores resultados (aumento de supervivencia, incremento del período libre de enfermedad y una mejor calidad de vida).

No obstante, la principal limitación y frustración en un proceso como es el desarrollo de la técnica de CRS + HIPEC, sería la aparición de enfermedad diseminada a distancia en poco tiempo.

Por tanto creemos necesario el fomentar la investigación clínica para poder identificar de una forma, lo más adecuada posible, a aquellos pacientes que van a presentar una enfermedad confinada a la cavidad peritoneal de aquellos que no, realizando un esfuerzo quirúrgico máximo en aquellos con enfermedad locorregional y no sistémica, con la intención de obtener unos resultados óptimos.

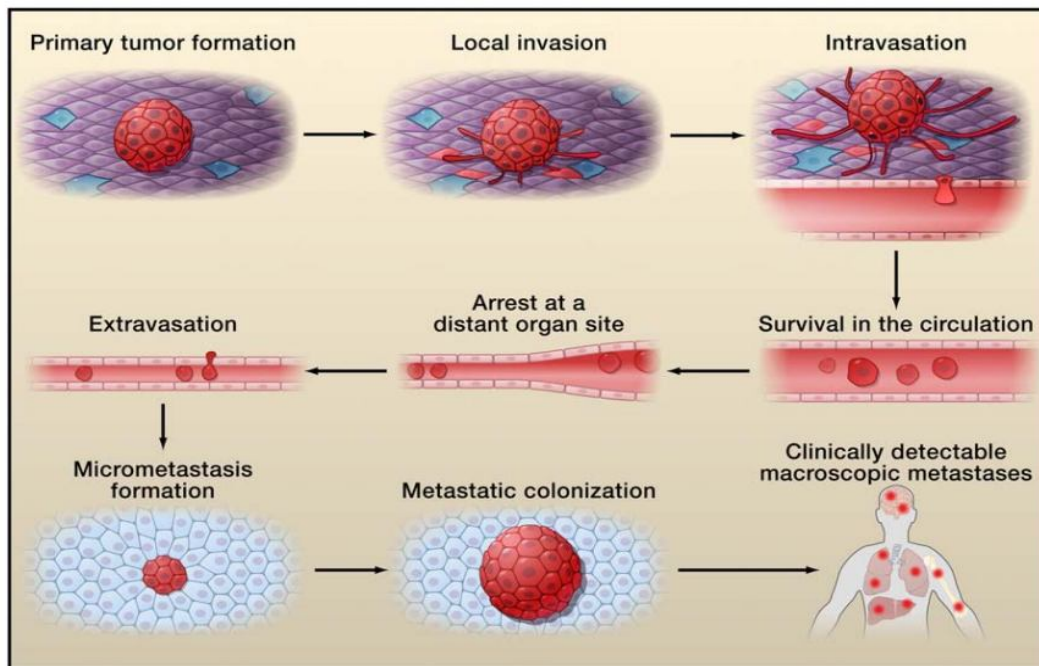


Figura 12: Mecanismo de metastatización. Adaptación Serrano et al. Ref 90.

Además de valernos de factores clínicos, pensamos que el estudio de factores genéticos y moleculares puede servir de ayuda a la identificación de estos pacientes. De hecho, ya se ha podido identificar el grupo de genes que marcan y median en el desarrollo de las metástasis pulmonares en pacientes afectos de cáncer de mama (89), así como estudios básicos en pacientes con CP.

Dentro de estos nuevos marcadores, la presencia de células tumorales circulantes (CTCs) se considera como factor indicativo de diseminación hematógica de la enfermedad tumoral (90, 91, 92, 93), con un considerable valor pronóstico en la posible formación de metástasis a distancia, lo que excluiría a pacientes potenciales a la terapia de CRS + HIPEC.

Las CTCs se definen como células epiteliales encontradas en la sangre periférica de pacientes con cáncer, la cuales presentan un núcleo intacto y expresan la citokeratina, sin expresar CD45 (marcador de células blancas), siendo células del tumor primario que se han separado del mismo o de las posibles metástasis existentes, y que se encuentran circulando en sangre periférica (94).

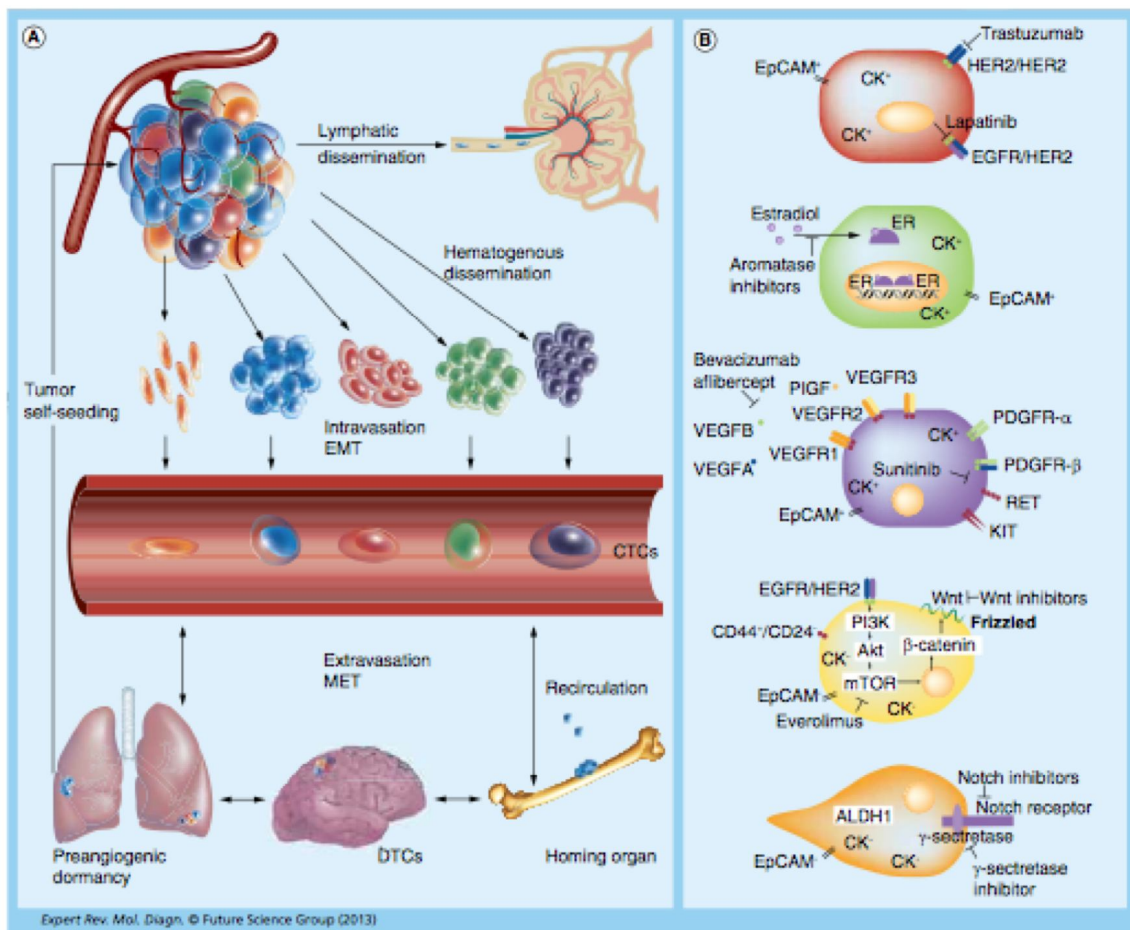


Figura 13: Formación CTCs. Adaptación Serrano et al. Ref 90.

Tal como aparece recogido en los estudios de J.G. Tralhao et al (95), el cáncer colorrectal es una enfermedad relativamente común y prevalente. En pacientes sometidos a cirugía curativa, entre un 20 y un 45% desarrollarán recurrencia local o enfermedad metastásica a distancia en ganglios linfáticos,



hígado, pulmón o peritoneo. Tradicionalmente la correlación entre estadio TNM y pronóstico ha sido lo que ha guiado la toma de decisiones en lo que a adyuvancia se refiere, pero existe una variabilidad en el comportamiento tumoral y en la evolución del paciente que no puede ser evaluada solo con estos marcadores, ya que, lo que clásicamente se ha considerado como factor determinante en el pronóstico de la enfermedad y en la invasión del mismo, que es la presencia o no de adenopatías, no es del todo concluyente, dado que no todos los pacientes con adenopatías negativas están curados, ni todos los que presentan ganglios afectados fallecen de dicha enfermedad.

El objetivo de la adyuvancia es erradicar las células tumorales diseminadas que afectan a la supervivencia global del paciente y al intervalo libre de enfermedad. Los candidatos a adyuvancia son aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de desarrollar nuevamente enfermedad maligna, para ello nos basamos, tal como hemos mencionado, en valoraciones clínicas y hallazgos patológicos como es la afectación de ganglios linfáticos. En pacientes en estadio I y II de cáncer colorrectal, la quimioterapia parece no tener un gran beneficio, y es por ello por lo que no está indicada, salvo en pacientes de riesgo. No obstante, entre un 10 y un 20% de estos pacientes desarrollarán enfermedad metastásica con el paso del tiempo, por ello cobra importancia la necesidad de desarrollar marcadores pronósticos, que nos permitan identificar dentro de estos subgrupos, a pacientes de mayor riesgo, que puedan beneficiarse del empleo de nuevas terapias dirigidas. Esta evolución de los factores pronósticos puede cambiar el enfoque quirúrgico del tratamiento del cáncer colorrectal con o sin enfermedad metastásica. De ahí, la

necesidad de desarrollar nuevos marcadores, entre los que podemos destacar las CTCs (96).

En esta misma línea tenemos los trabajos de Thorsteinsson et al (97) quienes se preguntan cual sería el significado clínico de las CTCs en cáncer colorrectal no metastásico. Para ello llevan a cabo una revisión a lo largo de 10 años. Su interés es similar al de J.G. Tralhao, ya que plantean que, los pacientes afectos de cáncer colorrectal con un estadiaje favorable, no son sometidos a terapia adyuvante, y de ellos, hasta un 30% desarrollan metástasis y finalmente fallecen por progresión de la enfermedad. Por ello sería de capital importancia identificar de forma temprana qué pacientes presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedad metastásica después de la cirugía, no valiéndonos sólo del TNM sino identificando nuevos marcadores pronósticos, tales como las CTCs. Las conclusiones de esta revisión, informan sobre los resultados preliminares del empleo de CTCs como marcadores pronósticos en el cáncer colorrectal no metastásico, tanto antes como después de la cirugía, así para estos autores, la presencia de CTCs representa un menor tiempo de supervivencia libre de enfermedad y una menor supervivencia global, así como un mayor porcentaje de recurrencia a distancia.

Dichas células han sido prácticamente aisladas en casi todos los tumores, incluyendo: colon, mama, próstata, pulmón, ovario, páncreas, hígado, esófago, gástrico, renal, vesícula, tiroides, tumores orofaríngeos y melanoma.

Estas células son extremadamente poco comunes en pacientes sin enfermedad maligna. Además, pueden detectarse antes de la aparición de las metástasis, comportándose como un indicador predictivo.

Nagrath et al (98) las considera como una probable causa de la incurabilidad de la enfermedad metastásica y las consideran un área activa en la investigación del cáncer.

Un escalón temprano en el proceso del desarrollo metastásico es la suelta esporádica de células tumorales por parte del tumor primario, después de lo cual, dichas células se encuentran circulantes de forma libre en la sangre periférica. La naturaleza del cáncer como enfermedad sistémica viene definida por la diseminación temprana de células tumorales, incluso en tumores con un tamaño pequeño, tal como hemos referido previamente con ganglios negativos. Es aquí donde cobran importancia estas CTCs ya que parecen estar implicadas en la difusión de la enfermedad a distancia.

Se ha estudiado que más de un millón de células tumorales pasan al torrente sanguíneo por gramo de tejido tumoral. Aunque la presencia de CTCs no quiere decir necesariamente presencia de metástasis, ya que existe un proceso de una gran complejidad de eliminación de la mayoría de ellas, conocido como "metástasis ineficaz". Así, la mayoría de CTCs experimentan una anoikis, que consiste en una apoptosis inducida por la células indiferenciadas. Las células que presentan una resistencia frente a ese anoikis son las que sobreviven en sangre periférica. El funcionamiento de dichas células se basa en sus propiedades físicas que potencialmente les permite

pasar a la circulación, como puede ser el incremento de la elasticidad celular (99).

Incluso después de la diseminación hematológica, las células tumorales son altamente ineficaces, solo una pequeña proporción de dichas células extravasadas puede formar micrometástasis, mientras que la gran mayoría desaparecerán, siendo solo unas pocas las que progresarán y contribuirán al desarrollo de “nuevos tumores” .

Diversos estudios (100, 101, 102), han considerado la presencia de CTCs como un pre-estadio antes de la aparición de las metástasis a distancia de una forma clínica. En este proceso de extravasación y crecimiento se implican diversos mecanismos como la unión de células tumorales al endotelio vascular y su agregación.

Otro aspecto importante de las CTCs en la progresión de la enfermedad maligna es el desarrollo de fenotipos altamente metastásicos debido al intercambio genético entre las propias células tumorales. El epitelio mesenquimal transicional (EMT) puede ser también una llave para la propagación tumoral a través de las CTCs. En las CTCs aisladas de carcinoma de próstata o mama se ha encontrado que expresan genes relacionados con el EMT lo que puede contribuir al desarrollo de metástasis a distancia. Para la formación de metástasis las células se someten a un proceso invertido que se conoce como EMT. Sin embargo recientes estudios han demostrado que un pequeño subconjunto de CTCs es capaz de inducir la formación de metástasis. Estas células serían aquellas que expresarán Moléculas de Adhesión Celular

Epitelial (EpCAM) tales como serían CD 44, CD 47 y MET, si bien se trata de pacientes afectados de cáncer de mama (103, 104, 105) .

Según diversos análisis genéticos realizados en células aisladas (90,106), las células del tumor primario y de las metástasis presentan diversidad genética, ya que estas son células mutadas del tumor primario con capacidad de producir expansión clonal metastásica en el sitio de la metástasis.

Nadal et al (107) con una muestra de 98 pacientes afectas de cáncer de mama no metastásico demuestran por un lado, la importancia de emplear el perfil de las CTCs como biomarcadores a la hora de establecer una terapia personalizada, y por el otro la falta de correlación entre el tumor primario y los biomarcadores encontrados.

En este estudio partiendo de los subtipos moleculares descritos por Perou (108), se subdividen en grupos a partir de la inmunohistoquímica en función del grado de expresión del receptor de estrógenos (ER), de progesterona (PR), y del receptor del factor de crecimiento epitelial humano 2 (HER2). Luego dentro de estos subgrupos se estudia la presencia o no de citoqueratina (CK) o del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), el cual es considerado esencial en la migración celular y en el proceso de infiltración vascular. Por tanto el interés de este estudio reside en explorar la presencia de EGFR en CTCs de pacientes con cáncer de mama no metastásico. Tras proceder al estudio, la conclusión es similar, remarcan el

interés de estas CTCs como biomarcadores a la hora de decidir una terapia personalizada para cada paciente, y además resaltan la falta de asociación entre la expresión de receptores del tumor primario en las CTCs, lo que haría pensar en el uso de otra terapia. Aún así todos estos campos son de reciente investigación y necesitarían de estudios de cohortes con mayor número de pacientes.

La relevancia de la caracterización molecular en CTCs en cáncer de mama es patente. Estudios de Nadal et al (90) así lo demuestran, donde además demandan la falta de una estandarización y validación del proceso.

Definen la relevancia de las CTCs para cáncer metastásico y para no metastásico. Teniendo en cuenta que a día de hoy el cáncer de mama metastásico se considera incurable y que el objetivo de las terapias es prolongar la supervivencia, la monitorización de las CTCs puede ayudar a la toma de decisiones de cambio o no de tratamiento en función de los valores de las mismas, ya que un aumento de las mismas, pueden indicar una mala respuesta al tratamiento prescrito. En cáncer de mama no metastásico, la monitorización de las CTCs ayudaría a preveer el pronóstico de la enfermedad, empleado como otro marcador más de supervivencia.

La detección de CTCs en pacientes intervenidas de cáncer de mama, después de la cirugía, en fase de remisión de la enfermedad, puede hacer pensar en la latencia de la enfermedad. El hallazgo de células en división podría hablarnos de una reactivación. Si bien es un dato muy concreto, que

requiere de más estudios, pero revela la importancia de las CTCs en la evolución del manejo de la enfermedad maligna (108).

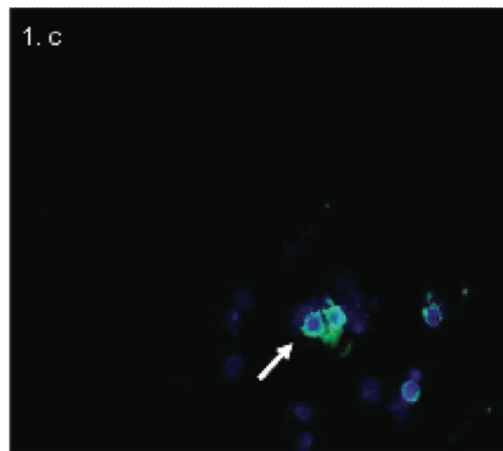


Figura 14: CTCs origen mamario. GENyO.

Cristofanilli et al (110) en su estudio prospectivo, doble ciego, multicéntrico, estudia el uso de CTCs para predecir la progresión libre de enfermedad y la supervivencia global en pacientes afectas de cáncer de mama metastásico las cuales comienzan una nueva línea de tratamiento. Considera el uso de las CTCs como predictor de supervivencia global, precoz, y con una indicación más reproducible que las actuales técnicas de imagen. para pacientes afectas de cáncer de mama metastásico, tal como lo refleja en sus trabajos.

En este estudio se compara la variabilidad radiológica en la respuesta a los tratamientos y la diferencia según el radiólogo, con las CTCs y su predicción en la supervivencia. Los autores concluyen que el estudio de las CTCs es más seguro para evaluar la eficacia del tratamiento y es más reproducible que el empleo de la radiología, ya que este estudio presenta limitaciones del tipo técnico, limitaciones interobservador, con una variabilidad del 15%, frente al 1% de las CTCs. Tradicionalmente se ha considerado que la

radiología era el método estándar para la evaluar la regresión de la enfermedad tumoral en pacientes afectas de cáncer de mama metastásico, pero no todas las lesiones se objetivan mediante estudios radiológicos.

Los datos presentados por Cristofanilli sugieren que el estudio seriado de las CTCs en pacientes afectas de cáncer mama metastásico puede emplearse para valorar su evolución al igual que el empleo de técnicas de imagen, con la posibilidad de poder ampliar este estudio a la biología molecular de las células y obviando las limitaciones existentes en el empleo de técnicas de imagen.

La presencia de las CTCs como factor pronóstico en la enfermedad tumoral, también está siendo estudiada para el cáncer de pulmón de células pequeñas. Satoshi Igawa et al (112) en su trabajo sobre CTCs apuntan sobre el papel de éstas como factor pronóstico. El cáncer de pulmón de células pequeñas es el que presenta una peor evolución, dado que entre el 60 y el 70% presenta enfermedad diseminada, con una supervivencia a los 5 años de entre un 1 y un 2 %. Las CTCs serían consideradas como excelentes marcadores de riesgo, ayudando a la estadificación, a la selección de terapias adecuadas y a la monitorización de la evolución de la enfermedad.

Este estudio (112) con 30 pacientes que presentan cáncer pulmón de células pequeñas, se determina la presencia de CTCs en 5 periodos distintos, 7 días antes de comenzar el tratamiento, al segundo y tercer ciclo de quimioterapia, después del cuarto ciclo y en el momento del estudio a fin de evaluar la progresión de la enfermedad. Existen un 93 % de pacientes en



progresión y un 83% de fallecimientos. El seguimiento fué de 12 meses. La detección de CTCs se elevó al 96% de los pacientes, presentando un mejor pronóstico aquellos cuyos valores era menores de 2 células por 7,5 ml de sangre, con una supervivencia neta de 14,8 meses en comparación con 3,9 meses de aquellos cuyos valores eran mayores. Por otro lado aquellos pacientes que no redujeron su valor de CTCs una vez comenzaron el tratamiento, presentaron una peor evolución. Por tanto la detección de estas CTCs puede ayudar a clasificar a los pacientes en respondedores o no respondedores en función de dichos valores y así poder variar la terapia a seguir. Los autores refieren que como limitaciones del estudio el número muestral y la necesidad de más estudios.

En el cáncer colorrectal puede existir una falta de concordancia entre el fenotipo mutado del tumor primario y las metástasis de hasta en un 23% para mutaciones del KRAS. Las mutaciones en KRAS y BRAF pueden ser identificadas en las CTCs , aunque la mutación del fenotipo de las CTCs no ha sido aún contrastado en las metástasis (111). Los analisis mutacionales en KRAS, BRAF y PIK3CA en células aisladas, demuestra heterogeneidad entre las propias CTCs del mismo paciente, lo que entre otros, contribuiría a explicar en parte la respuesta inconsistente a los inhibidores de EGFR, enfatizando sobre la importancia del analisis individualizado de las CTCs para identificar distintas subpoblaciones, por lo tanto no todas las CTCs producirán metástasis, ya que sus características pueden diferir de las células de las metástasis.

Diversos estudios (95, 97 ,112, 113, 114) han demostrado que la detección de las CTCs en sangre periférica es un indicador de mal pronóstico en aquellos paciente que presenten cáncer colorrectal.

Rahbari el al (113), presentan un metaanálisis con más de 36 estudios valorados, y donde se incluye unos 3094 pacientes de 11 países distintos (1990 – 2009). En este estudio, los autores tratan de demostrar que la presencia de CTCs en sangre periférica es un factor pronóstico en la evolución de pacientes con cáncer colorrectal, para ello se basan en la toma de muestras en el momento postoperatorio, ya que parece ser el momento más relevante, dado que combina el status preoperatorio, el intraoperatorio con la manipulación del tumor y la apoptosis inmediata en dichas células en el torrente sanguíneo. Deducen que la presencia de CTCs es un marcador per sé para el pronóstico de la enfermedad, siendo importante la toma de muestras pre y post-operatorias a fin de ser un marcador predictivo de la evolución.

Torino et al (114), insisten sobre la necesidad de desarrollar nuevos marcadores pronósticos en el cáncer colorrectal. Para estos autores la presencia de CTCs en pacientes afectos de cancer colorrectal está relacionado con el estadio de la enfermedad independientemente de los métodos de detección y de los marcadores usados, dado que la presencia de las mismas trás una cirugía radical o su elevación trás una nueva terapia, indica persistencia de la enfermedad o progresión y podría estar en relación con una falta de respuesta a la terapia prescrita. La presencia de CTCs a las 24 horas postcirugía con intención curativa (CC0) es indicador de mal pronóstico tanto

de recidiva como de supervivencia global, siendo este un factor independiente de supervivencia. En un estudio multivariable de Lu CY et al (116), las CTCs resultaron ser el indicador independiente con más valor predictivo positivo, más que la invasión perineural o los niveles elevados de CEA en suero durante el postoperatorio.

Akagi et al (117), estudiaron la presencia de células tumorales en ganglios linfáticos, en cavidad peritoneal, en sangre periférica (CTCs), en los drenajes quirúrgicos y en médula ósea. Concluyen que la determinación de CTCs en sangre periférica es útil para estimar la evolución de los pacientes en contraposición con otras determinaciones (médula ósea, drenaje o ganglios linfáticos).

Hasta este momento, hemos comentado la importancia de las CTCs en pacientes afectados de cáncer colorrectal no metastáticos y como su presencia influye en la evolución de los pacientes, siendo un factor pronóstico independiente en cuanto a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Además, existen algunas publicaciones que hacen referencia a su posible valor pronóstico/predictivo en cáncer colorrectal metastático.

Así, Cohen et al (118) presentan una serie de 430 pacientes afectados de cáncer colorrectal con enfermedad metastásica, los cuales estratifican en dos subgrupos en función de los niveles de CTCs mayor o menor de 3 en 7,5 ml de sangre periférica, considerando las CTCs como un biomarcador obtenido de forma no invasiva y con un gran potencial de utilidad clínica. Los resultados

indican de que el período de supervivencia es menor en pacientes con un nivel desfavorable de CTCs siendo también menor el período libre de enfermedad en dicho grupo (seguimiento de 25,8 meses y con un 71% de exitus a consecuencia de la enfermedad). Por tanto consideran las CTCs como un indicador con un fuerte factor pronóstico en la evolución de pacientes afectados de cáncer colorrectal con enfermedad metastásica, dado que pacientes que normalizaron sus niveles después del tratamiento presentaron una mejor evolución que aquellos que no lo hacen. Cohen insiste en las limitaciones y en la necesidad de más estudios sobre este tema.

Papavasilou et al (120) en un estudio prospectivo de 20 pacientes candidatos a cirugía de las metastásis hepáticas, observaron una significativa correlación entre la presencia de CTCs, supervivencia y período libre de enfermedad.

Más recientemente Seeberg et al (115), presentaron una serie de 194 pacientes afectados de metástasis hepáticas de origen colorrectal, a los cuales se les realizaba una determinación de CTCs justo en el momento preoperatorio. Se realizó cirugía de las metástasis hepáticas a 153 pacientes, 41 resultaron no resecables, con una media de seguimiento de 22 meses. En este estudio confirman el impacto de las CTCs en la progresión de la enfermedad tal como aparece reflejado en revisiones previas, además de identificar a las CTCs como factor independiente en el riesgo de progresión y mortalidad de la enfermedad.

La presencia de CTCs en pacientes afectados de enfermedad metastásica es un indicador de mal pronóstico y, dentro de esto, aquellos que presentan

mayor número de CTCs son considerados de mayor riesgo. Además, los autores consideran que una elevación en el número de CTCs una vez realizada la cirugía y comenzada la terapia adyuvante, refleja la falta de respuesta. En este trabajo, la determinación de CTCs es considerada como una “biosia líquida” con un importante valor pronóstico (evolutivo y de respuesta al tratamiento) (119).

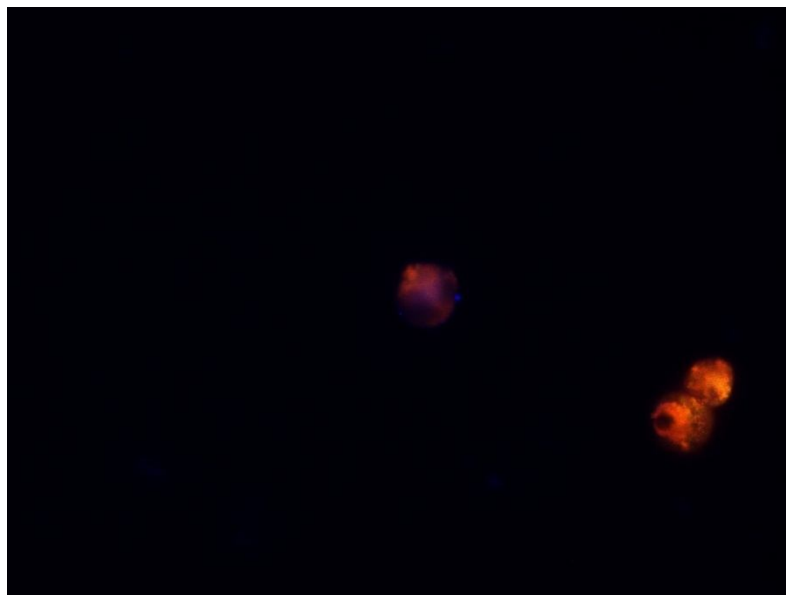


Figura 15: CTCs origen colónico. GENyO.

Torino et al (114), también hacen nuevamente mención a la relación de las CTCs en la enfermedad metastásica de paciente con cáncer colorrectal, considerando la positividad en CTCs como factor independiente lo que implica una menor supervivencia y con un menor tiempo libre de enfermedad.

Por su lado Tol J. et al (121) describen el valor pronóstico de las CTCs en cáncer colorrectal con enfermedad metastásica en un estudio prospectivo randomizado (fase III). En este estudio, las CTCs son determinadas en 755

pacientes tras una primera línea de quimioterapia, apreciando que pacientes que presentan CTCs positivas, presenta un peor pronóstico que aquellos que no presentan células tumorales circulantes.

Hashimoto et al (122) estudian el caso de un paciente con una metástasis pulmonar por cáncer de colon. En este trabajo debemos recordar que para llevar a cabo una metastasectomía pulmonar en pacientes afectos de cancer colorrectal, esta debe ser técnicamente resecable, presentar unos riesgos asumibles, el tumor primario debe estar controlado y además no presentar enfermedad extratorácica. En este caso el paciente cumplía todos estos factores y presentaba unos valores de CEA dentro de la normalidad. Previo a la toracotomía se extrajeron muestras de sangre periférica, donde se objetivo un recuento de CTCs de 6 CTCs /7,5ml. El paciente se sometió a la toracotomía y un mes después aparecieron múltiples metástasis ganglionares y óseas, falleciendo antes de los 3 meses. Los autores subrayan la importancia de las CTCs como factor predictivo de mal pronóstico.

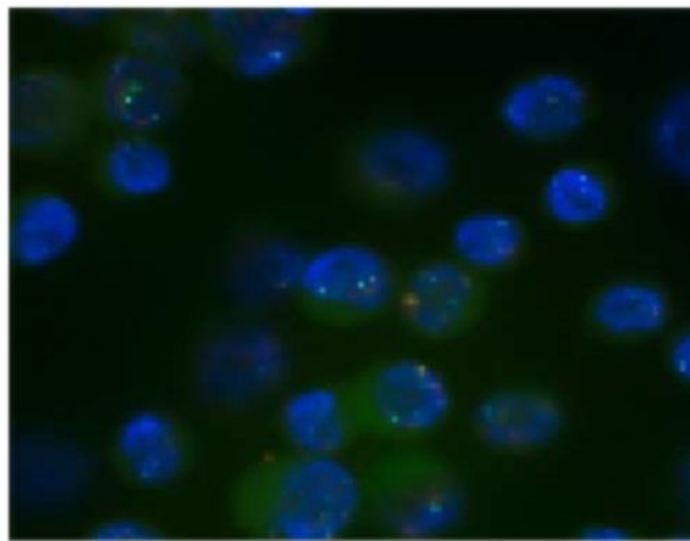


Figura 16: CTCs origen colónico. GENyO.

Como marcadores de enfermedad avanzada, está demostrado que, la correlación entre los niveles de CTCs y las características clínico patológicas, son indicadores de una enfermedad más avanzada, metastásica o no (123).

La presencia de CTCs en pacientes con cáncer de colon viene determinada por la expresión de CEA/CK20, la cual depende de varios factores/características como son: la profundidad del tumor, la invasión venosa, la presencia de afectación ganglionar, entre otros. Dentro de los marcadores expresados por las CTCs del cáncer de colon, la Plastin3- se ha relacionado , recientemente, con tumores T3-T4, metástasis linfáticas, metástasis hepáticas y diseminación peritoneal. Encontrándose en pacientes con recurrencia de la enfermedad, siendo sus niveles prerrecurrencial mayores que en enfermos no recidivados.

Como factor pronóstico, la presencia de CTCs en pacientes con cáncer colorrectal, presagia una mala evolución de la enfermedad, dado que se ha demostrado que pacientes que presenten positividad para ellas tienen un incremento de 2,5 veces el riesgo de mortalidad, diseminación y de progresión de la enfermedad. Un alto porcentaje de pacientes con metástasis de cáncer colorrectal que han tenido progresión de enfermedad o han fallecido, presentaban CTCs en sangre periférica a las 3 – 5 semanas después del tratamiento (124).

En base a todo lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que la presencia de CTCs es un factor pronóstico independiente y predictor de enfermedad metastásica.

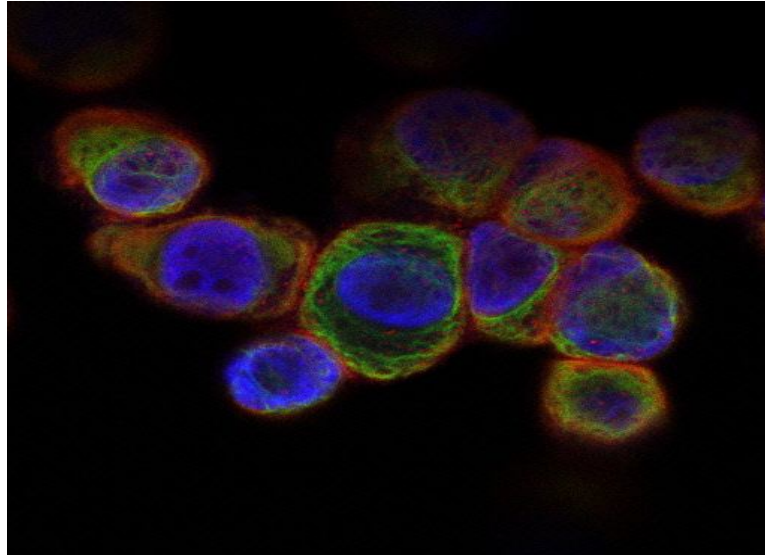


Figura 17: CTCs de origen carcinomatoso. GENyO.

En pacientes sin enfermedad metastásica (Estadio Duke B o C), la supervivencia fue menor en aquellos que presentaban CTCs. Esto no se aprecia en Estadio Duke A. Junto con la presencia de nódulos linfáticos afectados (N) la presencia CTCs a las 24h de una cirugía curativa es un factor predictivo positivo de recurrencia.

Por otro lado, pacientes con enfermedad metastásica y niveles elevados de CTCs que experimentan un descenso de los mismos después de 3 – 5 semanas tras quimioterapia, presentan una supervivencia libre de enfermedad similar a aquellos que comenzaron con niveles de CTCs favorables o nulos.

La positividad para Plastin3 también está asociada con un peor pronóstico, presentando una menor supervivencia libre de enfermedad aquellos pacientes que la expresan. En pacientes con Estadio B o C de Duke, la positividad para Plastin3, es un indicador de mala evolución, independiente de



la profundidad del tumor, del tamaño del mismo, y de la invasión linfática ó venosa.

Por último, también se ha observado que la presencia de CTCs en la sangre del drenaje intraabdominal, es un indicador de peor pronóstico, relacionándose con una menor supervivencia global y con la aparición de metástasis hepáticas.

En relación con todo lo anteriormente expuesto y dado que la técnica de CRS+HIPEC es un tratamiento local, ya que con ella se pretende eliminar la enfermedad macroscópica y microscópica asentada en “el órgano peritoneal” , sería importante identificar a aquellos pacientes portadores de una enfermedad “localizada” o locorregional” frente a aquellos otros enfermos portadores de una enfermedad diseminada/sistémica.

Por tanto, creemos necesaria la determinación de las CTCs en pacientes que pudieran ser candidatos a la realización de CRS + HIPEC a fin de poder ofrecer una terapia personalizada, con una optimización de recursos y con un beneficio máximo para el paciente.



## 2 ) HIPÓTESIS DE TRABAJO



La determinación y caracterización de CTCs, con características de células madre, puede tener importantes implicaciones en el conocimiento del proceso metastásico.

Acorde con los trabajos publicados, el proceso de diseminación tumoral, requiere la adquisición de una serie de características, que son propias de células progenitoras tumorales.

Los estudios realizados con CTCs parecen definir poblaciones celulares con determinadas características biológicas que le permiten sobrevivir en un medio hostil como sería la sangre. Entre estas características destacan principalmente: capacidad de autorrenovación, regulación del nicho, capacidad de acumular mutaciones a lo largo del tiempo, activación de rutas antiapoptóticas, capacidad de migración y de evasión, incremento de la actividad transmembrana e inducción de latencia tumoral. Todas estas características son propias de la célula madre.

La presencia de marcadores específicos de células madre nos identificaría una subpoblación de células circulantes con capacidad invasiva y proliferativa y , por tanto, con una elevada probabilidad de ser responsables del desarrollo posterior de nuevos focos tumorales.

La determinación del valor pronóstico que pueden tener estas CTCs en pacientes afectos de CP de origen colorrectal confinada al abdomen, puede

permitir diferenciar aquellos pacientes que presenten un mayor riesgo de recidiva.

Además la caracterización genotípica de dichas células permitiría el desarrollar terapias individualizadas acorde con el comportamiento biológico de dichas células.

En base a estos principios, se considera que la determinación y posterior caracterización fenotípica, genética y funcional de estas CTCs, nos aportará un mejor conocimiento del proceso de diseminación y de colonización tumoral, que se verá reflejado en una mejor adopción de medidas terapéuticas más eficaces e individualizadas, con una consiguiente mejora de la calidad de vida de dichos pacientes y un menor gasto sanitario.

## 3 ) OBJETIVOS





Los objetivos de nuestro estudio son los siguientes:

- 1) Aislar las células tumorales circulantes (CTCs) epiteliales presentes en la sangre periférica de pacientes con carcinomatosis peritoneal (CP) de origen colónico.
- 2) Caracterizar fenotípicamente dichas CTCs aisladas en base a la expresión de marcadores como EGFR.
- 3) Estudiar la evolución temporal de las CTCs, en relación con la cirugía, tomando muestras en el momento preoperatorio (día 0) y a las 6 semanas (antes de iniciar la quimioterapia sistémica), evaluando así el posible papel de la misma en la evolución de la enfermedad.
- 4) Identificar el valor pronóstico de la presencia de CTCs en pacientes con CP de origen colónico que son sometidos a cirugía con intención curativa mediante CRS + HIPEC, descartando la presencia de enfermedad sistémica.



# 4 ) MATERIAL Y MÉTODOS



#### **4.1 ÁMBITO DEL ESTUDIO Y PACIENTES**

El presente estudio es un trabajo multicéntrico desarrollado por el grupo de biopsia líquida y metástasis en el centro GENyO (Granada, Andalucía, España). junto con la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Programa de Cirugía Oncológica y Carcinomatosis Peritoneal, del Complejo Hospitalario de Torrecárdenas (Almería, Andalucía, España), que es además centro de referencia en Andalucía Oriental para el tratamiento de esta patología según la Consejería de Salud de Andalucía, SAS).

El trabajo que constituye esta tesis doctoral, ha sido realizado sobre pacientes con diagnóstico de Carcinomatosis Peritoneal (CP) de origen colónico, sometidos a tratamiento quirúrgico radical combinado con quimioterapia intraperitoneal hipertérmica intraoperatoria (CRS + HIPEC), y que no hubiesen recibido quimioterapia ni radioterapia una vez se llega al diagnóstico de CP, ajustándose además a unos estrechos criterios de inclusión y exclusión (Tabla 4 y 5).

#### **4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

Los criterios de inclusión de dichos pacientes para poder ser sometidos a CRS + HIPEC son los siguientes:

1. Carcinomatosis peritoneal de volumen tumoral peritoneal mínimo o moderado: índice de carcinomatosis peritoneal (ICP) igual o inferior a 20 o cinco regiones afectadas sobre siete. CG (ICP <12), PMP (en relación a tipo histopatológico).
2. Ausencia de metástasis a distancia extraperitoneales: hepáticas voluminosas o más de tres, pulmonares, óseas. Para descartarlas es imprescindible realizar una TC tóracoabdomino-pélvica, y si fuera necesario, tener confirmación por PET-TAC.
3. Obtención de una citorreducción quirúrgica macroscópicamente completa o con restos tumorales no superiores a 2,5 mm (CC0-CC1).
4. Edad > 18 años y < 75 años.
5. *Performance status (Eastern Cooperative Oncology Group):* < 2.
6. Esperanza de vida > 12 semanas.
7. Balance hematológico correcto: PNN <sup>3</sup> 1,5 x 10<sup>9</sup>/l, plaquetas <sup>3</sup> 100 x 10<sup>9</sup>/l.
8. Buena reserva hematopoyética.
9. Balance hepático correcto.
10. Ausencia de enfermedad ganglionar retroperitoneal voluminosa.
11. Ausencia de signos de oclusión intestinal multisegmentaria.
12. Ausencia de enfermedad grave cardíaca, pulmonar, hepática, renal o neurológica que contraindiquen la cirugía.
13. Buen estado general y nutricional.

Tabla 4: Criterios de inclusión en CRS+HIPEC

Al igual que cumplen los criterios de inclusión, es condición sine qua non la ausencia de los siguientes criterios de exclusión:

1. Pacientes con CP de origen mamario, biliar, pancreático o broncopulmonar.
2. Imposibilidad de un seguimiento adecuado del paciente.
3. Presencia de otra enfermedad tumoral maligna.
4. Infección activa u otra condición que impida o incapacite al paciente .
5. Obstrucción intestinal completa multisegmentaria.
6. Obstrucción biliar tumoral.
7. Obstrucción ureteral.
8. Afectación del hilio hepático.
9. Gran afectación adenopática retroperitoneal.
10. Extensa afectación del intestino delgado y/o retracción tumoral mesentérica.
11. Afectación vesical confirmada por citoscopia.
12. No aceptación del consentimiento informado específico para este tratamiento.
13. AFECTACION EXTRAABDOMINAL (ENFERMEDAD SISTÉMICA)

Tabla 5: Criterios de exclusión CRS+HIPEC

De todos los criterios de exclusión, aquel que presentó un mayor peso y una mayor importancia es la afectación extraabdominal, por que en este punto la CP deja de considerarse una enfermedad locorregional, pasando a considerarse sistémica, y por tanto, no es candidata a un potencial tratamiento quirúrgico local.

### **4.3 VARIABLES A ESTUDIAR**

Las variables que se han estudiado en esta tesis doctoral han sido aquellas incluidas en el Registro Nacional de Carcinomatosis Peritoneal, donde cada uno de los pacientes esta perfectamente identificado por iniciales y número de historia clínica y además un código de entrada en un archivo Excel,

además de por los datos introducidos en una Base de Datos diseñada para tal efecto.

#### **4.3.1. Variables independientes**

-Demográficas: tales como la edad expresada en años y el sexo

-Calidad de vida de los pacientes de acuerdo con la escala ECOG y ASA

-Comorbilidades asociadas a nuestros pacientes como Hipertensión Arterial, Diabetes Mellitus, cardiopatía, etc.

-Fecha de la cirugía.

-Abordaje realizado: Laparotomía media Xifo-púbica y técnica de CRS + HIPEC según técnica del Coliseo.

-Descripción visual de los implantes metastásicos de CP.

-Histología de los mismos, de acuerdo con el informe anatomopatológico, distinguiendo el grado de diferenciación tumoral, siendo este bien diferenciados, moderadamente diferenciados o indiferenciados; la afectación vascular y/o perineural.



-Tamaño tumoral en cm del tumor primario, medido en la pieza quirúrgica, así como de los implante, tanto mayores como menores y clasificados según el PCI de Jacquet y Sugarbaker.

Este sistema, tal como se ha explicado previamente, es el que se encuentra vigente actualmente para el estadiaje de la CP, el cual consiste en dividir la cavidad peritoneal en 13 regiones y en función de la presencia o no de implantes en cada una de estas regiones y el tamaño de los mismos, puntuarlos, y realizar un sumatorio, el cual nos dará un valor que abarca desde 1 hasta un máximo de 39, lo cual nos permite clasificar a los pacientes en 3 grupos, leve, moderado ó grave.

-Estadio patológico, de acuerdo a la clasificación internacional TNM

-El grado de citorreducción alcanzada, basado en el “Completeness Cytoreductive Score” propuesto por el Dr. P. H. Sugarbaker, el cual es una forma de reflejar el grado de citorreducción alcanzado en la cirugía, el cual va desde CC0, cuando la resección de los implantes es completa, hasta CC3, siendo lo residuos aquí mayores de 25mm

-Mortalidad postoperatoria, definida como aquella que acontece dentro de los primeros 30 días siguientes a la intervención ó durante la estancia hospitalaria. Se recogerían las fecha de la muerte, la causa de la misma, discerniendo entre origen cardiovascular ,respiratorio, etc.

-Morbilidad postoperatoria, considerada como aquellas complicaciones ocurridas en los 30 primeros días tras la intervención o hasta que se produzca el alta hospitalaria. Dichos eventos adversos se clasificaron de acuerdo con los criterios de toxicidad establecidos por el NCI - CTCAE VERSION 3.0, estratificando dichas complicaciones en Grado I como aquellas que no precisaron de ninguna actuación, Grado II como aquellas que precisaron de tratamiento médico. El Grado III se refiere a aquellas que precisaron de maniobras invasivas tales como drenajes percutáneos, colocación de drenajes pleurales, etc. Y por último el Grado IV como aquellas que precisaron de una reintervención o de un reingreso en UCI.

-Adyuvancia, en el caso que los pacientes hayan precisado la administración de tratamiento quimioterápico o radioterápico tras la cirugía.

-Tiempo de seguimiento, definido como aquel desde la intervención hasta Diciembre de 2014, fecha tope de la recogida de datos para su posterior análisis y estudio estadístico. Media de 27,6 meses (20-34 meses).

-Valoración de los niveles de CTCs en el momento previo a la CRS + HIPEC

-Valoración de los niveles de CTCs post cirugía, en un primer momento a las 6 semanas de la misma o bien en cualquier momento del seguimiento en el que se objetive de forma clínica, radiológica o analítica una posible recidiva peritoneal, hepática o a distancia, por ejemplo, pulmonar, ósea, cerebral, etc.

#### **4.3.2. Variables dependientes:**

-El estado del paciente una vez concluido el periodo del estudio, siendo este vivo o muerto, discerniendo en el primer caso sin libre o no de enfermedad

-La supervivencia global, expresada como el porcentaje de pacientes vivos al final de nuestro estudio.

-La supervivencia específica, definida como el porcentaje de pacientes vivos al final del seguimiento excluyendo aquellos fallecidos por otras causas.

-Intervalo libre de enfermedad, como el tiempo tras las cirugía en la que el paciente sobrevive sin presentar signos o síntomas de enfermedad neoplásica.

-Recurrencia locorregional o a distancia, definida como la reaparición de implantes peritoneales o en otro órgano respectivamente. En tal caso, se lleva a cabo una descripción detallada del órgano afecto, número de lesiones, tamaño de las mismas.

#### **4.4 MUESTRAS EMPLEADAS**

Las muestras sanguíneas fueron recogidas en tubos *CellSave®* (Veridex, Johnson & Johnson Company, LLC) y procesadas dentro de las 72h siguientes a su extracción de acuerdo con el protocolo establecido por nuestro grupo (Nadal, Fernández et al. 2012). Para su transporte se adoptaron las

medidas de bioseguridad, siguiendo el plan general de prevención de riesgos laborales de los Centros remitentes.

#### **4.4.1. Muestras de sangre de los pacientes**

A cada paciente se le extrajeron 2 muestras de 10 mililitros de sangre en dos momentos puntuales del proceso:

- la primera extracción (extracción basal) se realizó tras el diagnóstico, en el momento 0, el día previo a la CRS+HIPEC.
- la segunda muestra a las 6 semanas tras el tratamiento CRS+HIPEC y previo al comienzo de la quimioterapia sistémica adyuvante.

#### **4.4.2. Controles negativos**

Además de las muestras de sangre de nuestras pacientes, también se utilizaron para el estudio muestras de sangre procedentes de voluntarios sanos sin relación alguna con las pacientes incluidas en el estudio. Estas muestras se emplearon como controles negativos con la finalidad de detectar posibles falsos positivos.

#### **4.4.3. Líneas celulares de cáncer de colon.**

Para establecer la sensibilidad y eficacia de la metodología empleada en este estudio hemos utilizado tres líneas celulares de adenocarcinoma de colon obtenidas del *American Type Culture Collection* (ATCC).

La línea celular utilizada en la investigación fue: HT-29 (HT-29 ATCC® HTB-38™)

Se eligieron estas líneas porque presentan características diferentes.

- ✓ HT-29: Esta línea celular se caracteriza por niveles altos de Citoqueratina (CK) y EGFR.

#### 4.4.4. Controles positivos

Para llevar a cabo este estudio científico, las técnicas de laboratorio empleadas fueron puestas a punto previamente sobre controles positivos. Estos se hacen de manera periódica y simultáneamente con las muestras de las pacientes.

Los controles positivos se diseñaron a partir de las muestras de sangre periférica donadas por voluntarios sanos que se mezclaron con un determinado número de células tumorales procedentes de la líneas celular de cáncer de colon cultivada en el laboratorio: HT-29

Los controles positivos también permiten evaluar la sensibilidad de la metodología a la hora de aislar las CTCs. Para ello hemos realizado tres tipos de controles; variando el número de células tumorales que se mezclan con la sangre, poniendo 1000, 500 y 50 células tumorales en 10mL de sangre periférica respectivamente y posteriormente evaluamos la capacidad de recuperación de estas células. De este modo pudimos comprobar que la eficacia de la metodología rondaba entre el 45-50% de células recuperadas.

Línea celular	Ht-29		
Nº CTC 10MI/10 <sup>6</sup> PMN	1000	100	50
% de recogida	52	45	45

Tabla 6: Eficacia de la técnica

El protocolo seguido para crear los controles positivos se describe a continuación:

- 1) Decantar el medio de cultivo de tubo falcon en el que crecen las líneas celulares cultivadas y si es necesario aclarar con PBS.
- 2) Despegar las células del fondo de la placa con tripsina, PBS-EDTA o medio comercial Trypple Express (Sigma). Se depositan 2 mL del reactivo y se deja actuar durante un tiempo no superior a 2 minutos. Para potenciar su actividad es aconsejable dejar la placa en el incubador durante este periodo de tiempo.
- 3) Una vez despegado el cultivo añadir 10mL de PBS y decantar todo el contenido de la placa en un tubo de centrifuga.
- 4) Centrifugar a 1200 r.p.m. durante 10 minutos a 22°C con freno bajo.
- 5) Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2mL de medio de cultivo.
- 6) A continuación hay que evaluar la concentración celular. El recuento se hace en cámara de *Neubauer*. Esta cámara de recuento tiene una depresión en el centro de 0,1mm con respecto a la superficie que la divide en dos cuadrículas de 3 milímetros cuadrados cada una. Para hacer el recuento sobre la cámara *Neubauer* se coloca un cubreobjetos de 22x22 mm y en los bordes, superior e inferior, de éste se pipetea 10 µl de la suspensión celular. La muestra entra en la cámara por capilaridad. Bajo el microscopio óptico se cuentan las células que están en las cuatro cuadrículas grandes (marcada en rojo) y se hace la media (M).

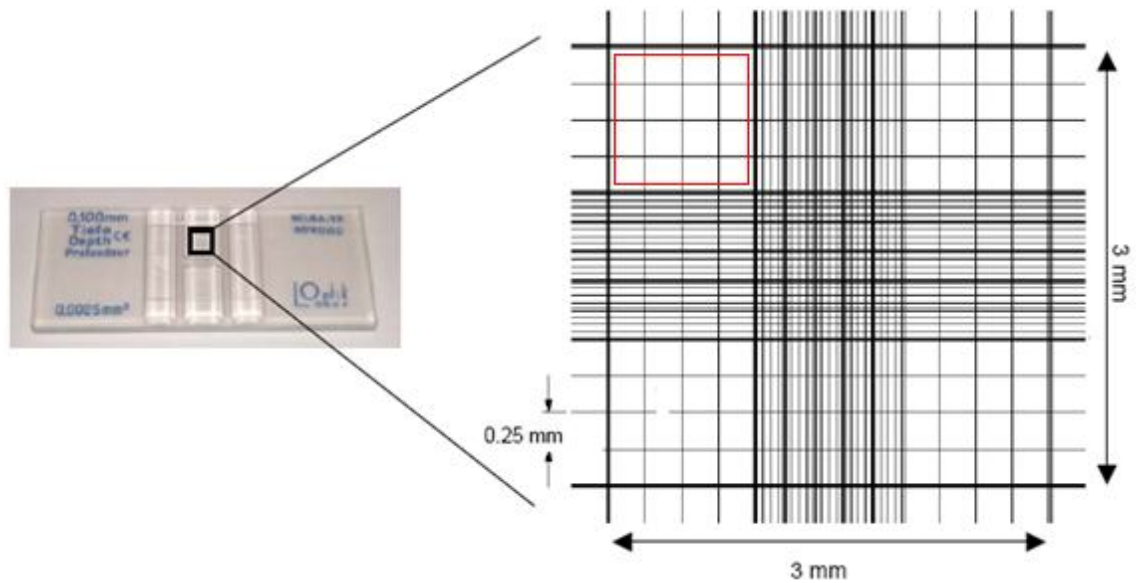


Figura 18: Cámara de *Neubauer*

- 7) Para calcular la concentración de células por mililitro se aplica la siguiente fórmula:

$$[\text{células / mililitro}] = 10000 \cdot (M/4)$$

- 8) Finalmente, preparar las diluciones apropiadas en función del número de células tumorales que se vayan a dispensar en las muestras de sangre control.

#### **4.5. ANÁLISIS REALIZADOS SOBRE LAS MUESTRAS DE SANGRE**

Las determinaciones analíticas que se realizaron sobre las dos muestras de sangre extraídas a las pacientes; una vez enriquecidas y fijadas sobre un porta las células tumorales circulantes presentes en ellas, fueron las siguientes:

- Muestra-1: expresión de citokeratinas, mediante tinción cromogénica enzimática.

- Muestra-2: Detección y fenotipado de CTCs mediante la expresión de citokeratinas y del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mediante doble tinción inmunocitoquímica.

## **4.6. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS**

### **4.6.1. Cultivo *in vitro* de líneas celulares**

El cultivo celular, técnica que consiste en hacer crecer *in vitro* células procedentes de líneas celulares (en nuestro caso células cancerígenas) en condiciones controladas, se realizó en RPMI 1640 1X (GIBCO) enriquecido con un 10% de seroalbúmina fetal bovina (HyClone) y suplementado con: piruvato sódico, bicarbonato sódico, antibióticos (penicilina y estreptomicina) para evitar contaminaciones y Hepes buffer para evitar que vare el pH.

Uno de los aspectos más importantes a considerar a la hora de trabajar con cultivos celulares es evitar la contaminación con hongos o bacterias que podrían matar a las células en crecimiento. Hay que prestar especial atención a la contaminación por micoplasmas. Para evitar la entrada de microorganismos contaminantes la manipulación de los cultivos se realizan en condiciones de esterilidad: trabajando en campana de flujo laminar, se trata de una cabina dotada de un sistema de propulsión y esterilización del aire por filtración, y también suplementando los medios de cultivo con antibióticos.

Así mismos se realizaron test de micoplasmas de la líneas celulares para descartar contaminaciones.



Los cultivos se incuban a 37°C, en un ambiente de humedad y con una mezcla de gases apropiada (5% de CO<sub>2</sub>) para mantener el pH óptimo de los medios de cultivo.

Las células cancerígenas crecen adheridas a una superficie y para ello se emplean superficies plásticas específicas (tubos Falcon®).

Antes de comenzar a trabajar con cultivos celulares se deben tomar las siguientes precauciones:

- ✓ Es muy importante cambiar el medio de cultivo uno o dos días antes de proceder a la congelación de las células u otro proceso. Dado que las células están en continua división y crecimiento se pueden generar una serie de problemas: agotamiento de nutrientes del medio, acumulación de células necróticas o apoptóticas, inhibición del crecimiento celular por contacto y diferenciación celular anómala.
- ✓ Si se observan alteraciones en la morfología celular hay que descartar ese cultivo.
- ✓ Los cultivos no deben dividirse precipitadamente, es aconsejable esperar a que haya una considerable densidad celular para que crezcan bien las células.
- ✓ Periódicamente se debe realizar un test de micoplasmas.

#### **4.6.2. Aislamiento y enriquecimiento celular**

El método de aislamiento de células mononucleares, granulocitos y de células de origen epitelial presentes en sangre periférica se basa en la creación de un gradiente de densidad con ficoll (1119 g/mL) que permite separar las células en función de sus diferentes densidades.

El gradiente se realiza vertiendo con cuidado la muestra biológica (sangre periférica) sobre el ficoll; este proceso se hace muy lentamente para evitar que las dos fases se mezclen. La fuerza centrífuga a la que es sometida la muestra provoca que las células mononucleares, los granulocitos y otras células de semejante densidad queden retenidos en la interfase entre el plasma y la solución de ficoll de 1119 g/mL.

Es aconsejable mantener las muestras de sangre a temperatura ambiente hasta su procesamiento y diluirlas 1:2 ó 1:4 para evitar sobrecargar el gradiente. Hay que atemperar el ficoll antes de su uso para asegurar mayor eficacia en la recogida de células.

Las etapas del procesamiento de la muestra se describen a continuación:

- 1) Se requieren 5 ml de ficoll 1119 por cada 10 ml de sangre venosa.
- 2) En un tubo cónico de 30mL, se depositan 5 ml de ficoll 1119.
- 3) A continuación se añade con cuidado la muestra de sangre, previamente diluida en PBS (5ml de PBS/10ml de sangre).
- 4) Centrifugar a 700x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C). La centrifugación ha de realizarse sin freno y con cabezal basculante.
- 5) Sacar con cuidado los tubos de la centrífuga. Aparecerán dos interfases, en la superior quedan retenidas las células mononucleares y en la inferior los granulocitos.

- 6) Aspirar la capa de células mononucleares mediante una pipeta pasteur, colocándola justo encima del halo y con cuidado de no arrastrar plasma, eritrocitos ni ficoll. Colocar las células en un tubo de 30 ml.
- 7) Lavar las células añadiendo 15ml de PBS y centrifugar a 200x g durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Eliminar el sobrenadante y resuspender en la solución apropiada para seguir el procesamiento adecuado.

#### **4.6.3. Selección positiva inmunomagnética**

El método de selección positiva inmunomagnética se basa en el aislamiento de las células diana dentro de una población heterogénea mediante la utilización del sistema MACS, que se basa en el uso de MACS<sup>®</sup> microesferas, MACS<sup>®</sup> Columnas y MACS<sup>®</sup> separadores (Miltenyi Biotec).

Las microesferas son partículas magnéticas de óxido de hierro de aproximadamente 50 nm de tamaño y biodegradables, las cuales no interfieren ni en la viabilidad, ni en la funcionalidad celular. Las microesferas están conjugadas con anticuerpos monoclonales, que reconocen específicamente las células de interés, dirigidos contra la CK-7, 8, 18 y 19.

Una vez marcadas, se aíslan mediante la utilización de las MACS columnas, colocadas sobre el separador magnético. Las columnas están diseñadas para soportar un alto campo magnético que permite que la fuerza magnética generada sea suficientemente fuerte para retener células marcadas con el anticuerpo conjugado con microesferas. La obtención de la población

celular de interés se consigue mediante la liberación de la columna de su separador magnético siendo recogidas en tampón de elución. Este procedimiento retiene a las células de origen epitelial marcadas magnéticamente en la columna y deja pasar las células hematopoyéticas: selección inmunomagnética positiva.

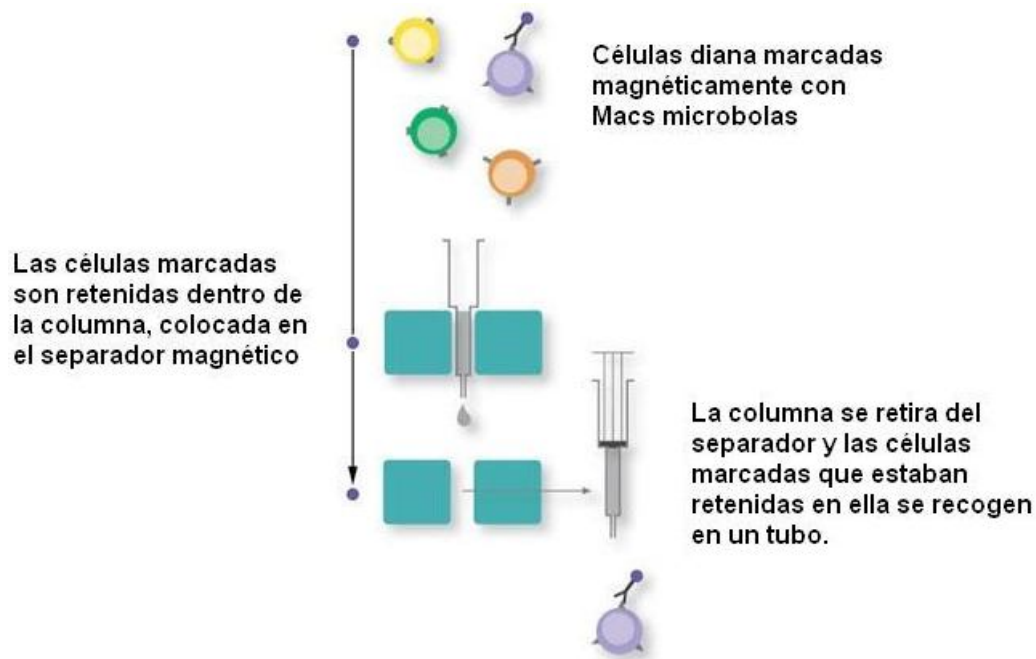


Figura 19: Selección Inmunomagnética.

Este sistema de separación celular basado en enriquecimiento inmunomagnético, permite seleccionar e identificar con mayor sensibilidad células tumorales diseminadas en sangre periférica, utiliza nanopartículas supermagnéticas unidas a anticuerpos específicos para marcadores de origen epitelial que no expresan las células hematopoyéticas maduras.

Los reactivos necesarios para el marcaje magnético y posterior selección vienen incluidos en el Kit de trabajo (*Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit*, Miltenyi Biotec). Todas las soluciones de trabajo deben ser utilizadas al 1x.

Los componentes del kit se describen a continuación:

- ✓ **Dilution Buffer 2x50 ml (10x).** Solución tampón de lavado (contiene azida). Preparar solución al 1x diluyendo en MiliQ filtrada, mezclando bien, inmediatamente antes de usar.
- ✓ **CellStain Solution 50 ml (10x):** Solución tampón de lavado que contiene azida y BSA. Esta solución requiere la preparación previa de Dilution Buffer 1x. Preparar inmediatamente antes de usar.
- ✓ **Solución de Permeabilización (CellPerm Solution);** Reactivo, que debido a que contiene detergente, produce poros en las células, permitiendo así el marcaje intracelular.
- ✓ **Solución Fijante (CellFix Solution):** Contiene formaldehído que hace posible la fijación de los poros inducidos por el permeabilizante, estabilizando la morfología celular. Se utiliza inmediatamente después del permeabilizante.
- ✓ **Macs Cytokeratin-Microbeads:** Esferas magnéticas (Macs Microbeads) conjugadas con el anticuerpo monoclonal anticitokeratina (Clon Cam5.2. Isotipo: mouse IgG2a).
- ✓ **FcR Blocking Reagent:** Evita uniones inespecíficas que puedan producirse. Algunas células presentes en la sangre, como monocitos y macrófagos, expresan receptores Fc que pueden unirse de forma inespecífica a las microesferas: Fc Blocking Reagent bloquea esta unión incrementando la especificidad.

Una vez que las células mononucleares son separadas del resto de fracciones celulares de la sangre, mediante gradiente de ficoll, se procede a su

marcaje y aislamiento por selección positiva inmunomagnética. Todo el proceso se debe realizar a temperatura ambiente (19-22°C).

Después de la separación de la fracción de células mononucleadas presentes en la sangre mediante gradiente de ficoll se llevan a cabo los siguientes procesos:

- Preparación de la muestra
- Marcaje magnético (incubación con el anticuerpo específico)
- Selección inmunomagnética

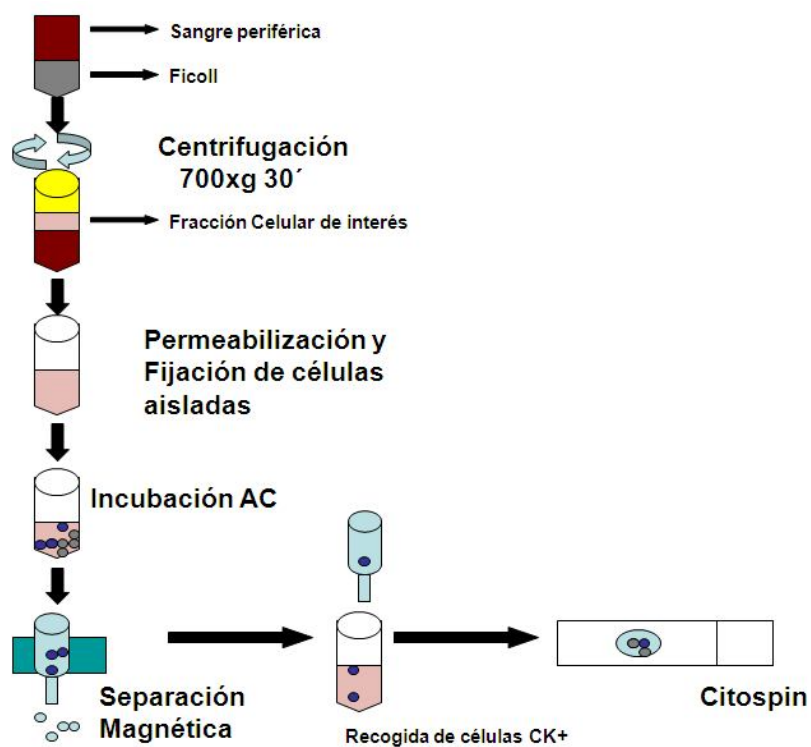


Figura 20

✓ **Preparación de la muestra.**

- 1) Resuspender en 2 ml de Dilution Buffer 1x, el pellet obtenido tras el último lavado que se le realiza a las células en la

selección leucocitaria, resuspender bien, con cuidado y añadir 8 ml más de Dilution Buffer volver a mezclar sin hacer burbujas. El volumen final será de 10 ml.

- 2) Añadir con cuidado 1,250 ml del reactivo CellPerm Solution, (se aconseja añadir el reactivo poco a poco y apoyando la pipeta en la pared del tubo, de esta forma se evita la aparición de grumos) mezclando bien sin hacer burbujas y dejar actuar durante 5 minutos exactos a temperatura ambiente.
- 3) Añadir con cuidado 1,250 ml del reactivo CellFix Solution, mezclando bien sin hacer burbujas e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Centrifugar a 300 x G durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 5) Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet celular golpeando suavemente el tubo con los dedos y después diluir en 5,5 ml de CellStain solution.
- 6) Centrifugar a 300 x G durante 10 minutos a temperatura ambiente.

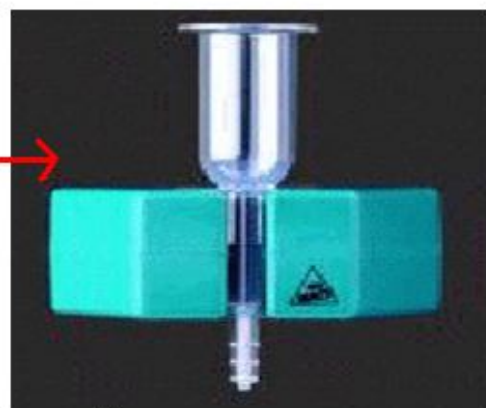
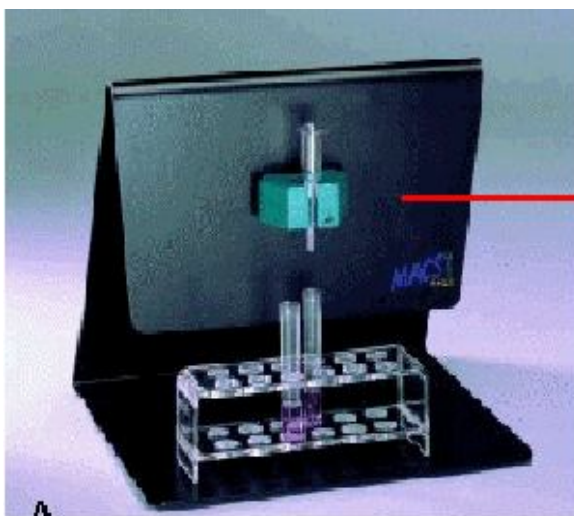
✓ **Marcaje Magnético.**

- 1) Resuspender las células en un volumen final de 150  $\mu$ l de CellStain solution en tubos de polietileno de 5 ml.
- 2) Añadir 50  $\mu$ l de FcR Blocking Reagent, mezclando bien pero sin hacer burbujas.

- 3) Añadir 50  $\mu\text{l}$  de Macs Cytokeratin-Microbeads mezclando bien pero sin hacer burbujas. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 4) Añadir CellStain Solution hasta un volumen final de 4 ml y centrifugar a 300 x G durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Resuspender y añadir CellStain hasta un volumen final de 1mL. Proceder a la separación magnética.

✓ **Separación Magnética.**

- 1) Aplicar la columna de separación positiva tipo MS<sup>+</sup>/RS<sup>+</sup> en el campo magnético del separador MACS.
- 2) Equilibrar la columna añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de 1x Dilution Buffer.
- 3) Pasar las células a través de la columna, no más de 500 $\mu\text{l}$  cada vez, apoyando la pipeta en la pared de la columna para evitar hacer burbujas.



Separador magnético  
miniMAC de Miltenyi Biotec

Figura 21: Separador Magnético



- 4) Eliminar las células no marcadas con las microesferas, que puedan quedar retenidas en la columna mediante 3 lavados, con 500µl de 1x Dilution Buffer, cada uno de ellos. Evitar la formación de burbujas.
- 5) Retirar la columna del separador y colocar sobre un tubo. Aplicar sobre la columna 1ml de Dilution Buffer y hacer presión con el émbolo que acompaña a la columna (a modo de jeringa) para recoger las células retenidas en ella.
- 6) Citocentrifugar en citocentrífuga Hettich (Tuttlingen, Germany) durante 10 minutos a 1500 rpm, utilizando embudos de doble cámara. Cada área sobre la que se deposita la solución celular mide 28 mm<sup>2</sup>. Estos embudos se colocan sobre portas de poli-L-lisina con filtro para recoger el volumen sobrante. El volumen de muestra que se vierte sobre cada embudo es de 0,5 mL.





Figura 22: citocentrifuga Hettich

- 7) Una vez realizado el citospin se dejan secar los portas al aire y finalmente se visualizan en un microscopio invertido para comprobar la eficacia del citospin.

Es extremadamente importante respetar los tiempos y la temperatura en las incubaciones; de lo contrario podremos obtener falsos positivos. Utilizar agua miliQ autoclavada y filtrada para la dilución de los distintos buffers. Y se recomienda realizar controles, tanto negativos como positivos, periódicamente como método de control de calidad del kit comercial.

#### **4.6.4. Detección de CTCs mediante tinción cromogénica**

La detección de las células de origen epitelial circulantes presentes en sangre periférica está basada en un sistema de marcaje directo de la proteína mediante un anticuerpo anticitokeratina y empleando una tinción cromogénica enzimática. Para este proceso se emplea un marcador específico de células de origen epitelial; concretamente, la citoqueratina (CK) que en ningún caso se va a expresar en las células de origen hematopoyético. Al tratarse de muestras

sanguíneas, la presencia de marcadores de origen epitelial no debe detectarse en condiciones fisiológicas normales.

Con esta metodología el marcador específico utilizado es un anticuerpo pancitoqueratina. La visualización de células positivas para la CK, es decir, células tumorales, se realiza en un primer paso mediante una tinción cromogénica basada en una reacción enzimática provocada por la unión de la fosfatasa alcalina con su sustrato (Fast Red TR/Naphtol). Esta reacción produce un precipitado de color rojo permanente visible con microscopia convencional. La contratinción del núcleo se realiza con hematoxilina tipo Mayer's. La utilización de esta metodología permite detectar las diferentes citomorfologías que presentan las células tumorales circulantes y los linfocitos con total claridad.

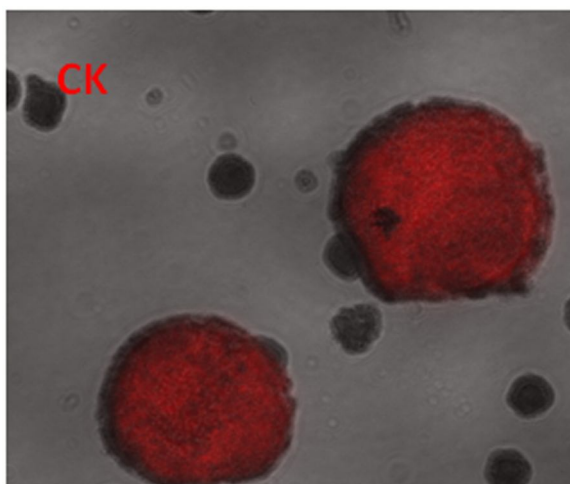


Figura 23: Detección de CTCs basada en la expresión de CK mediante la técnica APAP. GENyO.

Para proceder a marcar las CK con Fast Red hay que preparar previamente los reactivos; disolviendo las tabletas del kit en 1mL de agua MilliQ.

Para ello en un tubo eppendorf se pone 1mL de agua miliQ y se disuelve muy bien en primer lugar la tableta de Fast Tris Buffer; ayudándonos con el vórtex. A continuación, se disuelve la tableta de Fast Naphthol. Todo el proceso se realiza directamente sobre el portaobjetos.

- 1) La muestra se debe procesar siempre en cámara húmeda. Se puede fabricar la cámara húmeda con una caja de plástico o metal dentro de la cual se sitúa un papel humedecido sobre el que se coloca el porta que se pretende analizar. De este modo evitamos que la muestra se deshidrate.
- 2) El área celular se marca con un lápiz hidrofóbico o diamante para que nos facilite, una vez sumergido en los reactivos, saber donde se encuentran las células así como la incubación con los distintos reactivos.
- 3) Hidratar la muestra con PBS al 1x frío hasta cubrir todo el área celular o introduciendo la muestra en una jarra Coplin, durante 5 minutos.
- 4) Decantar con cuidado la muestra para eliminar el PBS 1x sobre un papel secante.
- 5) Proceder a la fijación de muestra con Carnoys (metanol-acetona, 3:1) frío conservado a -20°C durante 5 minutos.
- 6) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos para eliminar el Carnoys.
- 7) Depositar sobre el porta 100 µl e incubar en oscuridad y a temperatura ambiente en la cámara de humedad durante 30 minutos.
- 8) Decantar y lavar en PBS 1X durante 1 minuto.
- 9) Colocar el porta en la cámara de humedad y cubrir con hematoxilina. Dejar actuar durante 1 minuto (en función del número de células).

10) Lavar en PBS y dejar secar al aire para visualizar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss AXIOVER).

#### 4.6.5. Tinción inmunocitoquímica

Las moléculas con actividad de anticuerpos son herramientas que utiliza el sistema inmune para combatir agentes patógenos y reciben la designación genérica de inmunoglobulinas (Ig), también denominados gammaglobulinas. Todas las moléculas de Ig poseen una estructura común de cuatro cadenas polipeptídicas: dos grandes (pesadas o H) y dos pequeñas (ligeras o L).

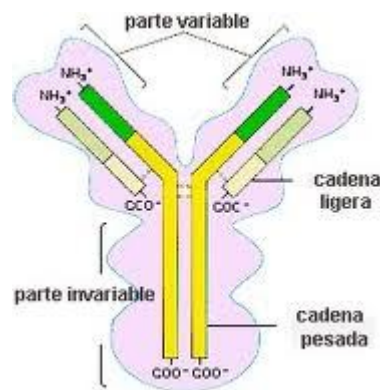


Figura 24: Inmunoglobulina (Ig)

Las Ig humanas y en la mayor parte de los mamíferos superiores se dividen en cinco clases, atendiendo a la estructura primaria de sus cadenas pesadas. Estas clases se designan como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Los anticuerpos se pueden unir a moléculas marcadoras, denominados fluorocromos, que permiten visualizar el lugar de reacción con sus respectivos antígenos.

Existen distintas técnicas de tinción mediante inmunofluorescencia:

- Directa; se utiliza un anticuerpo, ligado a un fluorocromo, específico frente al antígeno que se desea detectar.



Figura 25: Inmunofluorescencia directa

- Indirecta; se emplea un anticuerpo específico no marcado (primario) y seguidamente otro anticuerpo marcado con fluorocromo (secundario) que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario.

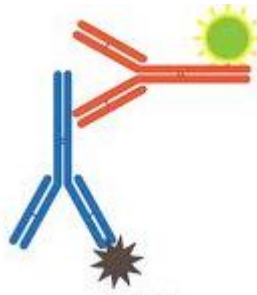


Figura 26: Inmunofluorescencia Indirecta

- Técnica de sándwich; se emplea para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas frente a un determinado antígeno en las células de tejidos pertenecientes a un animal previamente inmunizado con ese antígeno.

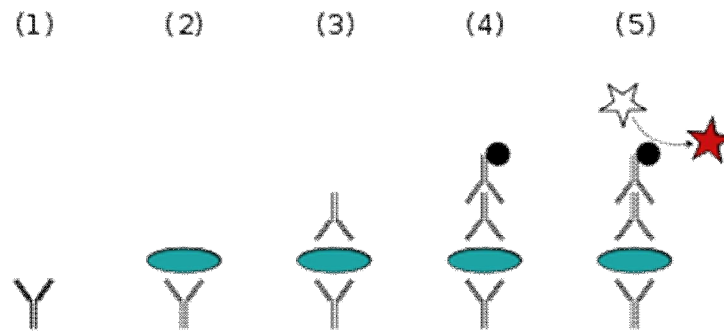


Figura 27: Técnica de Sandwich

- Incubación con complemento; es una modificación de la técnica indirecta, en ella el anticuerpo que se emplea en el primer paso de la técnica ha de ser capaz de fijar el complemento. Una vez realizada la primera incubación con dicho anticuerpo que a su vez es específico frente a un determinado antígeno se añade suero de fresco como fuente de complemento y se incuba. En una tercera fase se incuba con un anticuerpo específico frente a una determinada fracción del complemento, dicho anticuerpo específico irá marcado con un fluorocromo.
- Doble tinción; permite la determinación de dos anticuerpos de manera simultánea o secuencial. Para la técnica se emplean dos cromógenos que originen una coloración distinta en cada caso. Para evitar reacciones cruzadas deben emplearse antisueros obtenidos de distintas especies animales. Además siempre debe utilizarse en primer lugar el anticuerpo que da reacción más intensa y si se va a trabajar con anticuerpos tipo monoclonal y policlonal primero se usará el policlonal.

La tinción inmunocitoquímica permite la caracterización fenotípica de las CTCs mediante un doble marcaje directo sobre el porta con anticuerpos conjugados con fluorocromos. Los más utilizados habitualmente son: Alexa <sup>®</sup>, Rhodamine y DyLights.

El abanico de marcadores adicionales que se pueden utilizar es muy amplio e incluye tanto marcadores específicos de proteínas de superficie (por ejemplo: EGFR y CD133) como nucleares (por ejemplo: receptores hormonales, para estrógenos o progesterona) o intracitoplasmáticos (por ejemplo: CK). Para evaluar los resultados se requiere de un microscopio de fluorescencia.

El protocolo a seguir se describe a continuación. Es importante trabajar durante todo el proceso en oscuridad, en cámara de humedad y a temperatura ambiente.

- 1) Comenzar humedeciendo el porta en PBS 1X durante 5 minutos.
- 2) Decantar el exceso de PBS e incubar durante 30 minutos con 100µL del antisuero específico para el anticuerpo secundario para evitar falsos positivos diluido al 1:10 en PBS 1X.
- 3) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos.
- 4) Incubar durante 1 hora con 100µL del primer anticuerpo monoclonal anti-humano para la proteína específica que se desee estudiar (EGFR, CD133, RE ó RP) diluido al 1:25 en PBS con SBF al 10%.
- 5) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos.
- 6) Incubar durante 30 minutos con 100µL del anticuerpo secundario marcado con fluorescencia específico frente al anticuerpo primario diluido al 1:100 en PBS.
- 7) Lavar en PBS 1X durante 5 minutos.



- 8) Contrateñir con 5µL DAPI y visualizar en el microscopio de fluorescencia (Zeiss AXIOVER).

#### **4.7. ANALISIS ESTADÍSTICO**

Hemos llevado a cabo un análisis descriptivo de las principales variables del estudio, ya citadas previamente. Para aquellas variables cuantitativas se ha calculado la media y la desviación típica o mediana y percentiles, según la normalidad de los datos. Para las variables cualitativas se obtendrán las frecuencias absolutas y relativas, representando dichos datos en tablas y gráficos.

Se ha comprobado si los datos se ajustan a una distribución normal utilizando el test de Saphiro Wilk, con el fin de determinar si posteriormente se realizarán pruebas paramétricas o no paramétricas.

Para contrastar si existen diferencias entre los pacientes con determinación de CTCs favorable o no favorable según variables cuantitativas, se empleara la T-Student o Mann-Whitney. En el caso de comparación de variables cualitativas se ha empleado el test de Chi-cuadrado de Pearson o de Fisher cuando ha sido necesario.

Se ha realizado un análisis del intervalo libre de enfermedad por el método de Kaplan-Meier y se ha establecido una correlación entre la supervivencia libre de enfermedad y los niveles de CTCs (favorable o desfavorable), además de las variables analizadas más relevantes.

El nivel de significación considerado para todos los contrastes será de 0,05. El software utilizado para hacer el análisis estadístico es IBM SPSS Statistics 19. Todos nuestros resultados obtenidos han sido incluidos en una base de datos diseñada para este estudio.

#### **4.8. MEDIOS Y RECURSOS DISPONIBLES PARA REALIZAR ESTE ESTUDIO**

##### **4.8.1. Material inventariable**

Para la realización del presente proyecto, se ha contado con el equipamiento de las Unidades Comunes del Centro GENYO y con los medios técnicos y humanos de la Unidad de Cirugía Oncológica Peritoneal-Carcinomatosis del Complejo Hospitalario Torrecárdenas de Almería, así como de colaboraciones necesarias e imprevistas.

La Unidad de Cirugía Oncológica Peritoneal-Carcinomatosis cuenta con todos los medios técnicos necesarios para llevar a cabo las técnicas de Citorreducción Completa más Quimioterapia Hipertérmica Intraperitoneal. Disponemos de un quimioperfusor digitalizado homologado por la FDA (Belmont). Además disponemos de personal cualificado y de todos los medios para llevar a cabo los diversos procesos quirúrgicos requeridos. Contamos también con una habitación aislada para este tipo de postoperatorios.

En cuanto a la parte experimental (determinación de CTCs y genómica) todas las determinaciones se han realizado, como ya hemos mencionado, en la Unidad de Biodinámica y Microambiente Tumoral del Centro GENYO (Granada), donde disponen de:

-Plataforma de aislamiento celular inmunomagnético (MiniMACS, Miltenyi Biotec)

-Cabina de flujo laminar seguridad tipo II

-Unidad especializada en cultivos celulares, primarios y establecidos. Consta de incubadores, cabinas de flujo laminar, microscopios, centrifugas, baños para incubación, contadores celulares.

-Unidad de microscopia y microdissección: Microscopio Axio Imager A1 (Zeiss), Confocal LSM 710, Nikon eclipse 90i, Microdisector Laser Palm Microbeam IV

-Centrífuga de rotor vasculante refrigerado

-Hibridador

-Termociclador

-Centrífuga digital refrigerada para tubos tipo Eppendorf

-Ciclocentrífuga

-Baño

-Micropipetas

-Equipo de electroforesis para AN

-Transiluminador

-Microscopio óptico

#### **4.8.2. Material bibliográfico**

El grupo tiene acceso a diversas plataformas bibliográficas: Biblioteca Virtual Andaluza

#### **4.8.3. Personal**

En nuestro equipo contamos con 3 especialistas clínicos, 2 cirujanos especializados en la cirugía oncológica peritoneal, y 1 oncólogo. Este equipo eminentemente clínico trabaja de forma estrecha con el la Unidad de Biodinámica Tumoral, constando con 1 investigador M.D. PhD. Especialista en análisis genético de muestras mínimas. Biólogo molecular. Además algunas de nuestras acciones precisan del apoyo personal de integrantes del equipo de Anestesiología y Reanimación como de la enfermería de nuestra Unidad de Cirugía Oncológica Peritoneal – Carcinomatosis.

5 )

Resultados



### **5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.**

14 pacientes, diagnosticados de CP de origen colónico, fueron incluidos en este estudio. Todos los pacientes debían cumplir los criterios de inclusión y exclusión ya mencionados, incluida la ausencia de enfermedad fuera de la cavidad peritoneal (enfermedad sistémica). Dichos pacientes procedían tanto de nuestro centro, como derivados de otros hospitales de la Comunidad Andaluza y fueron tratados en la UGC de Cirugía del Complejo Hospitalario Torrecárdenas de Almería.

### **5.2. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CTCs.**

Para llevar a cabo el análisis de las CTCs, a todos los pacientes seleccionados se les realizaban dos extracciones: una previa a la intervención quirúrgica (Basal) y otra a las seis semanas de realizar la CRS+HIPEC.

En la determinación de CTCs basal, de los 14 pacientes analizados 7 (50%) fueron positivos para la presencia de CTCs. El número medio de CTCs detectadas fue de 5,5 CTCs/10ml de sangre periférica (rango 3-8). Tabla 7.

		N(%) Basal	
		CTC-	CTC+

N= 14		7 (50%)	7 (50%)
-------	--	---------	---------

Tabla 7

En cuanto a la segunda determinación, realizada a las 6 semanas de la cirugía, 4 de los 14 pacientes analizados (28,57%), eran positivos para la presencia de CTCs, con un número medio de células de 6,75 células/10 ml de sangre periférica (rango de 4-10). La persistencia de CTCs durante el seguimiento se observó que, en 3 de los 7 pacientes que eran positivos en la extracción basal fueron negativos para la presencia de CTCs después del tratamiento. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la detección de CTCs antes de la intervención vs la detección después de CRS+HIPEC ( $p=0,28$ ). Figura 28

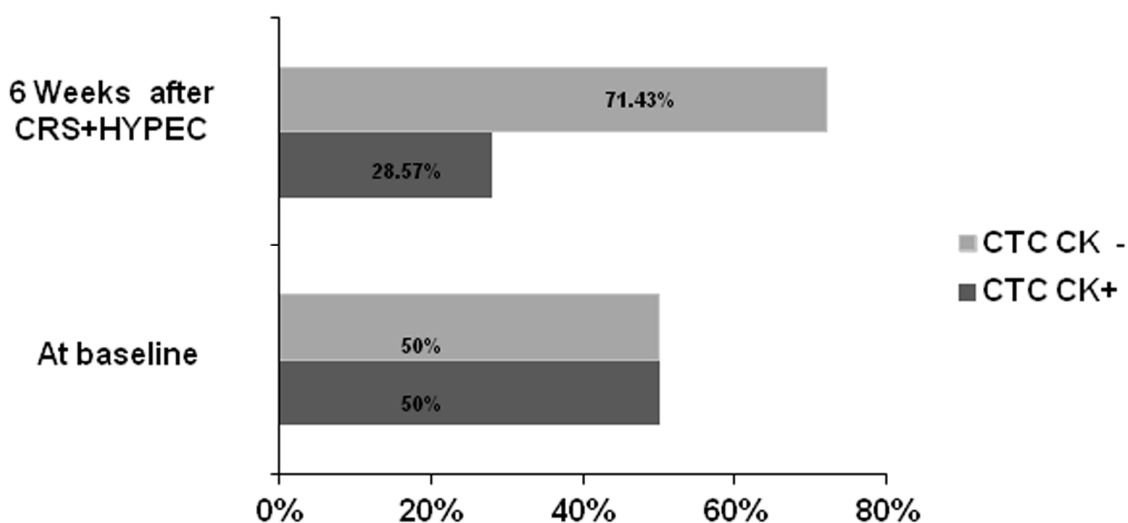


Figura 28

### 5.3. CORRELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS Y LA PRESENCIA DE CTCs.



Con el objetivo de determinar el impacto clínico que la presencia de CTCs pudiera tener en este tipo de pacientes se correlacionaron las diferentes características clínico-patológicas de los pacientes con la presencia y ausencia de CTCs. La correlación existente entre la presencia de CTCs antes y después del tratamiento se encuentra descrita en la Tabla 8.

	CTCs Basales	CTCs 6 Semanas
Positivas	7 (50%)	4 (28,6%)
Negativas	7 (50%)	10 (71,4%)

Tabla 8

En el análisis de las diferentes variables, se observó que en características como el sexo, que incluía 3 hombres y 11 mujeres, el 100% de las muestras procedentes de hombres (3/3) eran negativas para la presencia de CTCs en la extracción basal, mientras que en el caso de las mujeres solo el 37% (4/11) resultaron negativas ( $p=0,009$ ). Tabla 9.

		CTC-	CTC+
<b>Sexo</b>			
Hombres	3	3 (100%)	0 (0%)
Mujeres	11	4 (37%)	7 (63%)
<b>Edad</b>	X 57,7 años	52,14	63,42
Hombre X: 55			
Mujeres X: 58			

Tabla 9

En cuanto a la situación del tumor primario, la localización es bastante similar en lo que se refiere a colon derecho e izquierdo. La determinación de CTCs, se muestra similar en ambos grupos, con una positividad del 50% (3/6) en pacientes afectos de neoplasia en colon derecho, y un 43% (3/7) en pacientes afectos de neoplasia en colon izquierdo, no encontrando diferencias significativas ( $p=1$ ). Tabla 10.

	CTC -	CTC +
<b>Localización tumor primario</b>		
Colon derecho. N= 6	3 (50%)	3 (50%)
Colon izquierdo. N=7	3 (43%)	4 (57%)
Colon transverso. N=1	1 (100%)	0 (0%)

Tabla 10

Del mismo modo, se pudo observar una tendencia estadísticamente significativa con la presencia de CTCs, al analizar la relación existente entre los pacientes que presentaban obstrucción y los que no. Así, los 3 de los 14 pacientes analizados y con obstrucción diagnosticada, fueron positivos para la presencia de CTCs en extracción basal 3/3 (100%), mientras que aquellos que no presentaban dicha complicación, 11 de los 14, la determinación resultó ser positiva en 4 de ellos (36,36%) ( $p=0,09$ ). Tabla 11

	CTC -	CTC +
<b>Complicados (obstrucción). N=3</b>		
Obstruidos	0 (0%)	3 (100%)
No obstruidos	7 (63,4%)	4 (36,6%)

Tabla 11

A la hora de clasificar el estadio de la enfermedad de nuestros pacientes en el momento de la primera cirugía nos regimos por la clasificación de *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, se comprobó en extracción basal, existía una correlación positiva entre el estatus TNM y la presencia de CTCs. Así 7 de los 14 pacientes positivos para CTCs fueron clasificados en estadios avanzados de la enfermedad, concretamente en estadios IIIc y IV. 4 de los 8 pacientes en estadio IIIc eran positivos para la presencia de CTCs (50%) y 3 de los 3 pacientes en estadio IV presentaron CTCs antes de la cirugía (100%). Sin embargo los pacientes con TNM IIIA y IIIB (3/14) fueron negativos para la detección de CTCs (3/3, 100%) ( $p=0.04$ ). Tabla 12

		CTC -	CTC +
<b>Estadaje Tumoral</b>			
III A-B	N= 3	3 (100%)	0 (0%)
III C	N= 8	4 (50%)	4 (50%)

IV	N= 3	0 (0%)	3 (100%)
----	------	--------	----------

Tabla 12

Otro punto a tener en cuenta en nuestros pacientes, sería el grado de diferenciación tumoral. Nuestra serie analizada quedaba dividida en bien y moderadamente diferenciados con 8/14 pacientes, de los cuales 5/8 (62,55%) presentaban negatividad para la determinación de CTCs en el momento basal, 6/14 pacientes presentaban un grado de pobremente diferenciado, en este caso 2/6 (34%) presentaban negatividad. (p=0,296). Tabla 13

		CTC -	CTC +
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien/ Moderado	N= 8	5 (62,55%)	3 (37,5%)
Pobremente	N= 6	2 (34%)	4 (66%)

Tabla 13

Por otra parte, no pudimos encontrar ninguna relación estadísticamente significativa con otras variables clínicas como pueden ser la edad, el tamaño tumoral, o el tipo de quimioterapia. (p=0,5)

Mención aparte, tiene la determinación del estatus de la mutación del gen K- Ras. En nuestra serie 6/14 (42,85%) pacientes presentan K-Ras nativo y de estos 4/6 (66%) presenta positividad para la determinación de CTCs, mientras que de los 8/14 (57,14%) que presentan K-ras mutado, 3/8 (37%) de ellos muestran positividad en la primera determinación de CTCs. (p=0,296), Tabla 14.

		CTC -	CTC +
<b>K- Ras</b>			
Nativo	N= 6	2 (34%)	4 (66%)
Mutado	N= 8	5 (63%)	3 (37%)

Tabla 14

Otra variable estudiada es el uso o no de quimioterapia adyuvante una vez llevada a cabo la cirugía del tumor primario y su relación con la presencia o no de CTCs. De los 14 pacientes de nuestra serie, 11 de ellos (78%) recibieron adyuvancia postoperatoria (siendo anti-EGFR para aquellos con K-Ras nativo y anti-VEGFR para quienes lo presentaban mutado), siendo el valor de las CTCs en la primera determinación similar, con un 54,6% de negatividad en las mismas y 45,4% de positividad. De los 3 pacientes que no recibieron adyuvancia, 2 de ellos se debió a la sincronicidad en la presencia de la Carcinomatosis peritoneal con el tumor primario, y en 1 de ellos a que fue etiquetado como Estadio IIIa y se desestimó la quimioterapia. La positividad en CTCs fue de un 67%. (p=0,5). Tabla 15.

		CTC -	CTC +
<b>Quimioterapia Adyuvante tras cirugía del tumor primario</b>			
Si	N= 11 (78%)	6 (54,6%)	5 (45,4%)
No	N= 3 (22%) 2 sincrónicos y 1 IIIA	1 (33%)	2 (67%)

Tabla 15

Una variable a tener en cuenta en cuanto a la potencial utilidad de las CTCs como biomarcadores de progresión y predicción de la enfermedad es el PCI de cada uno de los pacientes. El PCI estratificado como hemos explicado previamente, en 3 grupos, atendiendo a la voluminosidad de las lesiones y la extensión de las mismas por cada una de las 13 celdas virtuales, creadas para tal propósito. Observamos como la gran mayoría de los pacientes se encuentran agrupados en el segundo escalón, PCI moderado que abarca desde los 10 a los 20 puntos, ambos inclusive, con una positividad para CTCs de 45%, similar al 50% del siguiente grupo. (p=1). Tabla 16.

		CTC-	CTC+
<b>PCI</b>			
<10	N=1	0 (0%)	1 (100%)
10 -20	N= 11	6 (55%)	5 (45%)
>20	N= 2	1 (50%)	1 (50%)

Tabla 16

#### **5.4. CORRELACIÓN ENTRE ESTATUS EGFR EN CTCs Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS**

Adicionalmente se realizó una caracterización de las CTCs en cuanto a la expresión de EGFR en todas aquellas muestras positivas para la presencia

de CTCs. La caracterización del EGFR en las CTCs se determinó tanto antes de la cirugía como tras el tratamiento quirúrgico.

En el análisis del estatus de EGFR en el momento basal, se observó que el 85,7% (6/7) de los pacientes CTC-CK+, eran también positivos para EGFR, exponiendo un fenotipo CTC<sup>CK+/EGFR+</sup>. Además, se pudo observar una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de CTC<sup>CK+/EGFR+</sup> en el momento basal y los pacientes que debutaron con un cáncer de colon obstructivo, 3/14 (21,4%) (100% vs 27,27%, p= 0,05). No obstante, no se encontró relación positiva entre el fenotipo CTC<sup>CK+/EGFR+</sup> y el resto de las características clínico-patológicas de los pacientes, incluyendo edad, tamaño tumoral, afectación ganglionar o histología tumoral.

## **5.5. FACTOR PRONÓSTICO DE LA ENUMERACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS CTCs.**

El papel de las CTCs como factor pronóstico de la enfermedad se analizó mediante el estudio del intervalo libre de enfermedad (ILE).

En este contexto se analizó por un lado el papel pronóstico de la presencia de CTCs y por otro el papel pronóstico de estatus del EGFR a lo largo de todo el proceso evolutivo del pacientes.

Así en cuanto al análisis de la presencia de CTCs con relación ILE, en 12 de los 14 pacientes (2 de ellos se diagnosticaron de CP de forma sincrónica) se pudo observar, como en aquellos pacientes que presentaban positividad en la primera determinación de CTCs, mostraban también un menor

ILE en comparación con aquellos que presentaron negatividad para dicha determinación. Tabla 17

	CTC -	CTC +
<b>Intervalo Libre de enfermedad (ILE)</b>	24,27 meses	8,57 meses

Tabla 17

En el segundo caso que implica la determinación de CTCs postquirúrgicas, la CRS+HIPEC consiguió una citorreducción completa en 11/14 pacientes (71,42%), de los que la determinación de CTCs posterior fue positiva en 3/11 de ellos (27%). En cuanto a los pacientes en los que no se consiguió una citorreducción completa, la detección de CTCs solo se observó en 1/3 (33%) de estos pacientes (Tabla 18).

		CTC - (6)	CTC +(6)
<b>Grado de Citorreducción</b>			
CC0-CC1	N= 11	8 (73%)	3 (27%)
CC2-CC3	N= 3	2 (67%)	1 (33%)

Tabla 18

Finalmente, en el seguimiento postquirúrgico, el análisis estadístico mediante Kaplan-Meier de la progresión de la enfermedad, mostró una clara correlación estadística entre esta y la presencia de CTCs ( $p=0,024$ ). En efecto, un total de 4 pacientes desarrollaron enfermedad durante el seguimiento, concretamente 2 pacientes tuvieron recurrencia pulmonar y hepática, una recurrencia pulmonar solo y el otro recurrencia hepática solo. 3 de 4 pacientes



(75%) mostraban positividad a la determinación de CTCs después de llevar a cabo la CRS+HIPEC. El paciente con diseminación pero negatividad para la presencia de CTCs, debutó como cáncer obstructivo.

Siguiendo el análisis evolutivo de los pacientes, 7/14 (50%) continúan vivos y libres de enfermedad sistémica y de recidiva peritoneal. Los 7 pacientes (100%) presentaron determinación negativa de CTCs después de la cirugía, en 6/7 pacientes (86%) la determinación basal fue positiva, pero se negativizó en la siguiente determinación a los 6 meses después de la CRS+HIPEC.

De los 14 pacientes del estudio, 3/14 (21,42%) han fallecido, y 1/3 presentaba determinación de CTCs positivas tras la cirugía. De estos 3 pacientes, solo 2 son valorables, queriendo enfatizar en que aquellos pacientes que fueron sometidos a CRS+HIPEC no presentaron recurrencia peritoneal. Nuestra supervivencia específica es de 11/14 (78,58%). Figura 29.

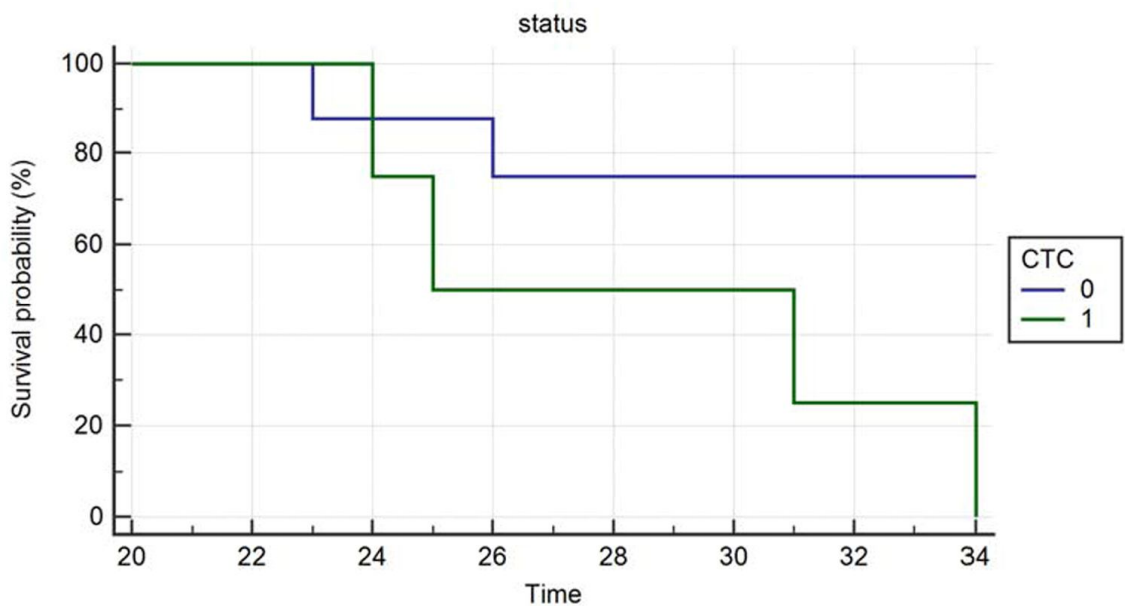


Figura 29

En cuanto a la relación existente entre el fenotipo CTC<sup>CK+/EGFR+</sup> e ILE no se pudo encontrar relación estadística entre dicha fenotipo en el momento basal y la presencia de diseminación tumoral ( $p=1$ ). Después de la cirugía solo se detectaron en 2/6 (33,3%).

En cuanto a la correlación de CTC<sup>CK+/EGFR+</sup> e ILE realizado tras la cirugía, se observó mostraba que 3/7 pacientes (43%) que estaban libres sin enfermedad eran negativos para la expresión del EGFR. Además en el análisis de pacientes vivos con enfermedad 4/14 (28,6%), 3 de ellos presentaban CTC<sup>CK+/EGFR+</sup> (75%). Además, de los pacientes fallecidos 3/14 (17,7%) solo 2 de ellos fueron evaluables, y presentaban un 50% de expresión, uno era positivo CTC<sup>CK+/EGFR+</sup> mientras que el otro no.

6 )

Discusión



El peritoneo, en forma de Carcinomatosis Peritoneal (C.P.), es la segunda región más común de enfermedad metastásica, después de las metástasis hepáticas, en pacientes intervenidos de cirugía con intención curativa en el cáncer colorrectal, y representa el 50% de las recurrencias.

El objetivo de este estudio es determinar el valor de la detección y caracterización de Células Tumorales Circulantes (CTCs) como marcador pronóstico, que nos permita identificar qué pacientes con CP de origen colónico, podrían beneficiarse realmente de un tratamiento tan agresivo como es la citorreducción completa más quimioterapia hipertérmica intraoperatoria intraperitoneal (CRS+HIPEC).

Hasta hace poco tiempo, el tratamiento convencional de la CP de origen colónico se ha basado fundamentalmente en la administración de quimioterapia sistémica con intención paliativa. No obstante, poco a poco la CRS + HIPEC ha ido ganando protagonismo en el manejo y tratamiento de la CP en pacientes seleccionados, siendo el principal criterio para llevarla a cabo, la ausencia de enfermedad metastásica a distancia, es decir pacientes con CP confinada al abdomen, junto con otra serie de criterios.

Por otra parte, la supervivencia global mostrada por estos pacientes, tras la CRS+HIPEC, está íntimamente relacionada con la extensión de la enfermedad y con la cantidad de enfermedad residual después de la citorreducción (70). En efecto, a pesar de llevarse a cabo un meticuloso estudio preoperatorio, mediante las ya mencionadas pruebas diagnósticas (34, 35 ,42),

la recurrencia de la enfermedad tras la cirugía primaria con intención curativa es común, y muy frecuentemente multifocal y sistémica, quedando excluidos de esta forma dichos pacientes para un tratamiento más agresivo (68), dado que, como ya hemos referido, el principal factor excluyente sería la presencia de enfermedad extraabdominal. Por tanto, es necesario encontrar nuevos biomarcadores que nos estratifiquen con mayor exactitud, los pacientes susceptibles de ser tratados con este tipo de intervención.

En los últimos años, el análisis basado en la detección de CTCs en diversos tipos de tumores, como pueden ser el cáncer de mama, próstata o pulmón, ha despertado un gran interés (90, 108, 110). En efecto, la presencia de CTCs está actualmente admitida como un factor indicativo de mal pronóstico, y por tanto indicador de diseminación tumoral hematógica en diversos tumores, que incluyen el cáncer de colon (95, 96, 97, 123). Además la presencia de CTCs, se considera un paso esencial aunque no suficiente para el desarrollo metastásico, por lo que podría ser interpretado como un dato con un significativo valor pronóstico en la formación de metástasis a distancia (91). Así lo apoyan diversos estudios que ponen de manifiesto la importancia en el seguimiento de la CTCs en el cáncer de origen colónico (112, 113).

En efecto, diversos estudios han demostrado la asociación existente entre la detección de las CTCs y el riesgo de muerte en pacientes afectados de diversos tipos de tumores de origen epitelial como pueden ser mama, pulmón y colon. Los resultados de estos estudios han permitido incluir la detección de CTCs en sangre periférica, como una nueva herramienta clínica para el

seguimiento de los pacientes, considerándose actualmente como un factor pronóstico (90, 109, 112, 113).

Siguiendo este razonamiento, las CTCs podrían ser consideradas como precursores metastásicos capaces de iniciar una lesión clonal metastásica. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que las CTCs son eventos extraordinariamente raros, entendiéndose por ello el pequeño número en el que son detectadas. Aunque poco a poco parece que la comprensión del proceso metastásico está avanzando, todavía queda mucho por entender sobre mecanismos genéticos, fenotípicos y funcionales implicados en dicho evento.

Lo que si sabemos es que el proceso metastásico es altamente ineficiente, en el sentido de que pocas células tumorales presentan la capacidad y la habilidad suficiente para sobrevivir en un ambiente tan hostil como la sangre, y poder finalmente desarrollar una metástasis. Lo que también podría explicar las limitaciones implícitas al proceso y que se correlacionan con las limitaciones técnicas para poder estudiarlo.

El interés en el estudio de este proceso, con especial énfasis en la CTCs, ha permitido que hayan aumentado el número de estudios en los que se valida la capacidad predictiva y pronóstica de las CTCs en diversos tipos de tumores sólidos.

La sangre periférica ha sido históricamente uno de los especímenes más importantes de diagnóstico para el control de las CTCs, debido principalmente

a la facilidad de recolección de las muestras, ya que es un proceso relativamente indoloro y que puede ser llevado a cabo de forma más asidua.

Está extensamente aceptado que las CTCs tienen la habilidad de recaer en sangre y alcanzar órganos a distancia, principalmente hígado y/o pulmón en el caso del cáncer colorrectal. Así las CTCs podrían servir como una biopsia líquida en una práctica clínica habitual determinando muestras en sangre periférica y puede representar una alternativa a las clásicas biopsias invasivas (116).

En base a los estudios realizados, la “US Food and Drug Administration” (FDA) aprobó en 2007 el uso del equipo CellSearch® (Veridex, LLC) para la detección de CTC y su potencial utilidad como herramienta pronóstica en pacientes afectas de cáncer de mama metastásico. Estableciendo por consenso, que la determinación de 5 CTC en 7,5 ml de sangre periférica identificaba a pacientes con alto riesgo de recaída (124).

En nuestro caso el proceso de detección y análisis de CTCs, está basado en una metodología similar al CellSearch, puesto que se fundamenta en el aislamiento de células mediante un método inmunomagnético, si bien nuestro método a diferencia del anterior es manual y no automatizado. La principal razón de esta elección, es la posibilidad de aislar las células tumorales circulantes mediante marcadores diferentes al EpCam, cuya eficacia, está actualmente bajo debate. En efecto, nuestra metodología, permite no solo el aislamiento con marcadores diferentes al EpCam, en este estudio fue una Pancitoqueratina el marcador de elección (ya descrita en material y métodos)



sino que también nos permite fenotipar con marcadores adicionales, en función del proceso biológico y el tipo de tumor que nos interese analizar.

El caso que nos ocupa se pudo realizar la caracterización de CTCs mediante el EGFR, la cual es una característica importante en los tumores colónicos y en la CP. Esta caracterización nos permitió describir la existencia de clones celulares con diferente capacidad proliferativa y por tanto con diferente capacidad para ser eliminadas por la quimioterapia. Aún con esta expresión, muchos de ellos no responden a terapias específicas para los mismos.

En nuestro trabajo hemos analizado la implicación clínica que el estatus del EGFR en las CTCs pudiera tener con respecto a la evolución de la enfermedad. En nuestro análisis no se pudo encontrar relación estadística con el periodo libre de enfermedad, pero si se detectó una negativización de la determinación de CTCs en la segunda determinación, tras realizar CRS+HIPEC, lo que parece indicar el efecto del tratamiento sobre las mismas.

Resultado aún más interesante la correlación existente entre los pacientes con fenotipo  $CTC^{CK+/EGFR+}$  en la determinación basal y el diagnóstico de obstrucción intestinal. Es especialmente interesante porque este subgrupo, junto con los tumores perforados, parecen mostrar una historia natural diferente, con mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia, especialmente en pulmón en hígado, lo cual se relaciona perfectamente con la presencia de  $CTC^{CK+/EGFR+}$ .

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que un mejor entendimiento de la biología de las CTCs, podría ser de utilidad para evaluar nuevas terapias diana basadas en los perfiles genómicos de las CTC.

En este mismo contexto, un estudio realizado por Cohen et al. sobre pacientes de cáncer de colon (117) demostraba que el número de CTCs antes y durante el tratamiento era un predictor independiente de progresión libre de enfermedad y de supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal en un estadio avanzado.

En el caso de pacientes con CP, nuestros resultados, correlacionan la presencia de CTCs con una mayor probabilidad de diseminación de la enfermedad. De hecho pacientes positivos para la presencia CTCs fueron diagnosticados como pacientes con enfermedad recurrente diseminada. En consecuencia estos pacientes pueden estar desarrollando metástasis a distancia. Esto puede contribuir a mejorar de una forma individualizada el seguimiento y la detección precoz de recurrencia de la enfermedad, considerando que pacientes que presenten positividad para la determinación de CTCs, pueden estar desarrollando enfermedad metastásica, y de esta forma ayudar a la estratificación de los pacientes de cara a un tratamiento más o menos agresivo, consiguiendo que sea el tratamiento el que sea, la efectividad del mismo sea la mayor posible.

Puesto que la bibliografía respecto en este campo, es nula y dado que solo existe una publicación al respecto y solo se analiza un paciente (125)

nuestro trabajo se basa en los antecedentes referidos en otro tipo de tumores sólidos (113, 114, 120). Así, para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo un análisis de CTCs en diferentes momentos temporales (0-6 semanas). El momento 0, como ya hemos comentado, sería el previo a la CRS+HIPEC, y a las 6 semanas, previo a comenzar la adyuvancia con quimioterapia sistémica. De esta forma se relaciona la presencia de CTCs con el potencial efecto de CRS+HIPEC, en los 14 pacientes afectos de CP de origen colónico, intervenidos con intención curativa en un primer momento. Siendo el principal objetivo determinar el significado pronóstico y predictivo de las mismas.

Así obtuvimos unos resultados que confirman el papel pronóstico de las CTCs en este tipo de afectación tumoral ya que confirmaban que la presencia de CTCs después de realizar CRS+HIPEC, se correlaciona con progresión de la enfermedad ( $p= 0,024$ ) donde los 4 pacientes con positividad para la misma desarrollaron enfermedad; 3 de ellos metástasis pulmonares, hepáticas y hepáticas y pulmonares y uno de ellos muere debido a la progresión de la enfermedad intraperitoneal.

A la hora de evaluar la potencial capacidad de las CTCs como factor predictivo, podemos considerarlas como una nueva herramienta con un importante valor predictivo en pacientes intervenidos de CRS+HIPEC. Así de los 7 pacientes que presentaban determinación negativa para CTCs tras la CRS+HIPEC, el 100% se encuentra vivo y libre de enfermedad en el momento de finalizar el estudio, aún cuando 6 de ellos mostraron valores positivos en la primera determinación, por tanto podría ser considerado como un factor

predictivo de buena evolución la negativización de las mismas, aunque serían necesarios trabajos con una muestra mayor.

Todos estos resultados sugieren pues, que la detección y caracterización de CTCs, puede considerarse como una excelente herramienta clínica en cuanto a su valor como marcador pronóstico y predictivo. Pero igual de interesante es la información biológica que el análisis de CTCs puede aportar para un mejor conocimiento del proceso metastásico y evolutivo de la CP. Una de las claves del proceso metastásico es la presencia de diferentes subpoblaciones de CTCs. La existencia de estas subpoblaciones identifica la capacidad para sobrevivir en diferentes ambientes que las CTCs pueden presentar, de forma que tendremos subpoblaciones de células tumorales con mayor capacidad para invadir un nuevo órgano y finalmente desarrollar una metástasis. Esta heterogeneidad no solo está presente entre las diferentes subpoblaciones de CTCs, sino también entre estas y el tumor del que proceden. Estas diferencias no solo se relacionan con la agresividad de la enfermedad sino también condicionan la potencial respuesta al tratamiento administrado (103, 104, 107, 109).

Por tanto el entendimiento de las características moleculares y funcionales de las CTCs, nos permitirá abordar mejor la manera de tratar la enfermedad, es decir tratando a los pacientes de una forma personalizada y precisa.

Los antecedentes descritos en otros tipos de tumores en referencia al análisis de CTCs, nos sugieren además que el desarrollo de nuevas dianas

terapéuticas dirigidas hacia las células que diseminan a sangre, pasa por el entendimiento y análisis de la biología de las CTCs.

No obstante, el principal obstáculo existente en el empleo de las CTCs como herramienta pronóstico y predictiva en clínica, es la automatización y también la detección de marcadores exclusivos de CTCs que identifiquen de forma fácil y específica todas las subpoblaciones existentes (126), esto nos permitiría el empleo el desarrollo de ensayos clínicos a gran escala (113, 114, 117, 120).

Otro concepto a tener en cuenta en base a los resultados obtenidos en este trabajo, en relación al impacto sobre la supervivencia libre de enfermedad que tiene la ausencia de CTCs en el postoperatorio, es que la negativización de las muestras tras la cirugía es un indicativo de la ausencia de focos tumorales subclínicos, mientras que la presencia de CTCs en el postoperatorio nos estaría indicando la existencia de elementos tumorales ocultos, que podrían ser responsables del vertido de CTCs y por tanto responsables de las posteriores recaídas de estos enfermos.

Es interesante también resaltar en este contexto, que la reducción de positividad para CTCs observada en las muestras tras la cirugía puede considerarse como un indicador de éxito del tratamiento administrado. De hecho, nuestros resultados están acordes con los resultados obtenidos por el grupo de Castro J. (125), donde se analiza el impacto clínico de la presencia de CTCs en CP de origen cecal, y que son tratados con CRS+HIPEC. Así la presencia o ausencia de CTCs después de la cirugía se consideró un indicador

de éxito o fracaso del tratamiento. Por tanto, la detección de CTCs puede ayudar a predecir la respuesta a CRS+HIPEC y tiene un importante papel para el seguimiento del paciente.

Para nuestro conocimiento este es el primer estudio que evalúa el potencial predictivo de las CTCs y sus características fenotípicas (expresión EGFR) en pacientes con carcinomatosis peritoneal de origen colorrectal. Además es el primer estudio que analiza la asociación entre el estatus de las CTCs y factores específicos clínico-patológicos.

En este estudio además, se ha puesto un especial énfasis en el estudio de la relación existente entre la presencia de CTCs y la probabilidad de desarrollar enfermedad metastásica en este tipo de pacientes.

7 )

Conclusiones





- 1) La CRS+HIPEC se ha revelado como una técnica excelente para el tratamiento de pacientes con CP de origen colónico, consiguiendo períodos de supervivencia superiores que con las terapias tradicionales.
- 2) La morbimortalidad inherente a este tratamiento hace necesario una adecuada selección de pacientes y un abordaje multidisciplinar en un centro especializado (de referencia) para poder conseguir una mayor eficacia del tratamiento.
- 3) Las CTCs se perfilan como un excelente biomarcador para la estratificación y selección de los pacientes susceptibles de ser sometidos CRS+HIPEC.
- 4) La determinación de CTCs es un factor pronóstico independiente del ILE.
- 5) El estudio fenotípico de las CTCs, EGFR+ CK+, puede ayudar al desarrollo de terapias dirigidas y personalizadas para cada paciente.
- 6) La CRS+HIPEC, ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la CP al correlacionarse con un descenso de las CTCs tras la misma mejorando la supervivencia específica y el ILE

7) Nuestra serie consta de una muestra pequeña, siendo necesario un estudio multicéntrico con una mayor N para poder correlacionar nuestros resultados.

8 )  
Bibliografía



- 1) Sugarbaker, PH, Langenbecks. Surgical management of peritoneal carcinosis: diagnosis, prevention and treatment. Arch Chir. 1988; 373(3):189-96.
  
- 2) Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 61-69.
  
- 3) Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group; US Multi-Society Task Force; American College of Radiology Colon Cancer Committee, Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a Joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force; American College of Radiology. CA Cancer J Clin. 2008; 58:130-60.
  
- 4) Cao C, Yan TD, Black D, et al. A systematic review and meta-analysis of cytoreductive surgery perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. Ann Surg Oncol. 2009;16 (8): 2152-65.

- 5) Esquivel J, Elias D, Baratti D, et al. Consensus statement on the loco regional treatment of colorectal cancer with peritoneal dissemination. *J Surg Oncol*. 2008; 98 (4): 263-7
- 6) Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, et al. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*. 2000; 88(2):358-63.
- 7) Jayne DG1, Fook S, Loi C, et al. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2002 Dec; 89(12):1545-50.
- 8) González Moreno S. Peritoneal Surface Oncology: A progress report. *Eur J Surg Oncol*. 2006; 32 (6): 593-6
- 9) Gómez Portilla A, Barrios P, Rufián S, et al. Management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy .*Eur J Surg Oncol*. 2006; 32 (6): 628-31
- 10) Gómez Portilla A, Cendoya I, López de Tejada I, et al. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. Current treatment. Review and update. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005; 97 (10): 716-37
- 11) Esquivel J, Piso P, Verwaal V, et al. American Society of Peritoneal Surface Malignancies opinion statement on defining expectations from cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal

chemotherapy in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2014; 110 (7): 777-8

12) Pingpank, James F. Diagnosis and Treatment of Peritoneal Carcinomatosis. Chapter 57. Hellman and Rosenberg 's De Vita. *CANCER, Principles and Practice of Oncology.* 8th Edition. Philadelphia. USA. : Lippincott. Williams and Wilkins, 2008; 2389-2399.

13) Richard H. Turnage. Kathryn A. Richardson, Benjamin D. Li, Jhon C. Mc Donald. Pared Abdominal, ombbligo, peritoneo, mesenterios, epiplón y retroperitoneo. Courtney M. Townsend. *Sabiston Tratado de Cirugía.* Barcelona, España : Elsevier, 2009; 1129-1154.

14) Tamsma, J. The Pathogenesis of malignant Ascities. *Peritoneal Carcinomatosis: A Multidisciplinary Approach.* *Cancer Treat Res.* 2007; 134:109-18.

15) Stelin G, Rippe B. A phenomenological interpretation of the variation in dialysate volume with dwell time in CAPD. *Kidney Int.* 1990; 38 (3):465-72.

16) Heath RM, Jayne DG, O'Leary R, et al. Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. *Br J Cancer.* 2004; 90 (7):1437-42.

- 17) Ceelen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol.* 2009; 10 (1):72-9
- 18) Williams R, White H. The greater omentum: its applicability to cancer surgery and cancer therapy. *Curr Probl Surg.*1986; 23(11):789-865.
- 19) Krist LF, Eestermans IL, Steenbergen JJ, et al. Cellular composition of milky spots in the human. *Anat Rec.*1995; 241(2):163-74.
- 20) Rangel-Moreno J, Moyron- Quiroz JE, Carragher DM, Kusser K, et al. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. 2009 May, *Immunity*, págs. 30(5):731-43.
- 21) Mebius, RE. Lymphoid organs for peritoneal cavity immune response: milky spots. *Immunity.*2009; 30 (5):670-2.
- 22) Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, et al. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol.* 2006; 169(5):1739-52.



- 23) Lawrance RJ, Loizidou M, Cooper AJ, et al. Importance of the omentum in the development of intra-abdominal metastases. *Br J Surg.* 1991; 78(1):117-9.
- 24) Sampson JA. Implantation peritoneal carcinomatosis of ovarian origin. *Am J Pathol.* 1931;7 (5):423-44.
- 25) Lifante JC, Glehen O, Cotte E, et al. Natural history of peritoneal carcinomatosis from digestive origin. Peritoneal carcinomatosis: a multidisciplinary approach. *Cancer Treat Res.* 2007; 134:119-29
- 26) Doki Y, Kabuto T, Ishikawa O, et al. Does pleural lavage cytology before thoracic closure predict both patient's prognosis and site of cancer recurrence after resection of esophageal cancer?. *Surgery.* 2001; 130 (5):792-7.
- 27) Rekhraj S, Aziz O, Prabhudesai S, et al Can intra-operative intraperitoneal free cancer cell detection techniques identify patients at higher recurrence risk following curative colorectal cancer resection: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol.*2008; 15 (1):60-8.
- 28) Ceelen WP, Morris S, Paraskeva P, et al. Surgical trauma, minimal residual disease and locoregional cancer recurrence. *Cancer Treat Res.* 2007; 134:51-69.

- 29) Hansen E, Wolff N, Knuechel R, et al. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg.* 1995; 130 (4):387-93.
- 30) Van den Tol MP, Haverlag R, van Rossen ME, et al. Glove powder promotes adhesion formation and facilitates tumour cell adhesion and growth. *Br J Surg.* 2001; 88(9):1258-63.
- 31) 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.
- 32) Carmignani CP, Sugarbaker TA, Bromley CM, Sugarbaker PH: Intraperitoneal cancer dissemination: Mechanisms of the patterns of spread. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22 (4):465-72.
- 33) Yan TD, Morris DL, Shigeki K, et al. Preoperative investigations in the management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Expert consensus statement. *J Surg Oncol.*2008; 98 (4):224-7.
- 34) González-Moreno S, González-Bayón L, Ortega-Pérez G, et al. Imaging of peritoneal carcinomatosis. *Cancer J.* 2009; 15 (3):184- 9.

35) Rivard JD, Temple WJ, McConnell YJ, et al. Preoperative computed tomography does not predict resectability in peritoneal carcinomatosis. *Am J Surg.* 2014; 207 (5): 764-5

36) Jacquet P, Jelinek JS, Chang D, et al. Abdominal computed tomographic scan in the selection of patients with mucinous peritoneal carcinomatosis for cytoreductive surgery. *J Am Coll Surg.* 1995; 181 (6):530-8.

37) de Bree E, Koops W, Kröger R, et al. Preoperative computed tomography and selection of patients with colorectal peritoneal carcinomatosis for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol.* 2006; 32 (1):65-71.

38) Jacquet P, Jelinek JS, Steves MA, et al. Evaluation of computed tomography in patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer.* 1993; 72 (5):1631-6.

39) Coakley FV, Choi PH, Gougoutas CA, et al. Peritoneal metastases: detection with spiral CT in patients with ovarian cancer. *Radiology.* 2002; 223 (2):495-9.

40) Yan TD, Haveric N, Carmignani CP, et al. Abdominal computed tomography scans in the selection of patients with malignant peritoneal

mesothelioma for comprehensive treatment with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*. 2005; 103 (4):839-49.

41) Huebner RH, Park KC, Shepherd JE, et al. A meta-analysis of the literature for whole-body FDG PET detection of recurrent colorectal cancer. *J Nucl Med*.2000; 41 (7):1177-89.

42) Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, et al. Staging of peritoneal carcinomatosis: enhanced CT vs. PET/CT. *Abdom Imaging*. 2008; 33 (1):87-93.

43) Pfannenberg C, Königsrainer I, Aschoff P, et al. (18)F-FDG-PET/CT to select patients with peritoneal carcinomatosis for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16 (5):1295-303.

44) Passot G, Glehen O, Pellet O, et al. Pseudomyxoma peritonei: role of 18F-FDG PET in preoperative evaluation of pathological grade and potential for complete cytoreduction. *Eur J Surg Oncol*. 2010; 36 (3):315-23.

45) Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, et al. A laparoscopy-based score to predict surgical outcome inpatients with advanced ovarian carcinoma: pilot study. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13 (8):1156-61.

- 46) Pomel C, Appleyard TL, Gouy S, et al. The role of laparoscopy to evaluate candidates for complete cytoreduction of peritoneal carcinomatosis and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol.* 2005; 31 (5):540-3.
- 47) Valle M, Garofalo A. Laparoscopic staging of peritoneal surface malignancies. *Eur J Surg Oncol.* 2006; 32 (6):625-7.
- 48) Garofalo A, Valle M. Laparoscopy in the management of peritoneal carcinomatosis. *Cancer J.* 2009; 15 (3):190-5.
- 49) Laterza B, Kusamura S, Baratti D, et al. Role of explorative laparoscopy to evaluate optimal candidates for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with peritoneal mesothelioma. *In Vivo.* 2009; 23 (1):187-90.
- 50) Lundberg O, Kristoffersson A. Port site metastases from gallbladder cancer after laparoscopic cholecystectomy. Results of a Swedish survey and review of published reports. *Eur J Surg.* 1999; 165 (3):215-22.

- 51) Curet, MJ. Port site metastases. *Am J Surg.* 2004; 187 (6):705-12.
- 52) Forones NM, Tanaka M. CEA and CA 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 1999; 46 (26):905-8.
- 53) Arjona Sánchez A, Medina Fernández FJ, Muñoz Casares FC, et al. Peritoneal metastases of colorectal origin treated by cytoreduction and HIPEC: An overview. *World J Gastrointestinal Oncol.* 2014; 6 (10):407-12
- 54) Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, et al. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (35):12493-500
- 55) Kouri M, Pychoen S, Kuusela P. Elevated Ca 19.9 as the most significant prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *J Surg Oncol.* 1992; 49 (2):78-85.
- 56) Goodman DB. The use of carcinoembryonic antigen as a tumor marker. *Ann Ass Clin Chem.* 1991; 9:5-17.
- 57) Ito S, Gejyo F. Elevation of serum CA 19-9 levels in benign diseases. *Intern Med.* 1999; 38 (11):840-1.
- 58) Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in

diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. In: Sugarbaker PH, editor. Peritoneal carcinomatosis: principles of management. Boston (MA): Kluwer Academic Publishers; 1996. p. 359–74.

59) Elias D, Blot F, El Otmany A, Antoun S, et al. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*. 2001; 92 (1):71–6.

60) Sugarbaker PH. Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999; 43:15–25.

61) Gilly FN, Carry PY, Sayag AC, et al. Regional chemotherapy and intraoperative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis. *Hepatogastroenterology*. 1994; 41 (2):124–9.

62) Van der Vange N, van Goethem AR, Zoetmulder FA, et al. Extensive cytoreductive surgery combined with intraoperative intraperitoneal perfusion with cisplatin under hyperthermic conditions (OVHIPEC) in patients with recurrent ovarian cancer: a feasibility pilot. *Eur J Surg Oncol*. 2000; 26 (7):663–8.

63) Blake Cady, MD *Basic Principles in Surgical Oncology*. *Arch Surg*. 1997; 132 (4):338-346.

- 64) Vallicelli C, Cavaliere D, Catena F, et al. Management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: review of the literature. *Int J Colorectal Dis.* 2014; 29 (8):895-8
- 65) Gómez Portilla A, Cendoya I, Olabarría L, et al, The European contribution to “Sugarbaker’s Protocol” for the treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101 (2):97-102
- 66) González Moreno S, Ortega Pérez G, González Bayón L. Indications and patient selection for cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy. *J Surg Oncol.* 2009; 100 (4):287-92
- 67) Gómez Portilla A. Peritoneal carcinomatosis. Ten years of applying the new combined triple therapy. Personal experience. *Cir Esp.* 2007; 82 (6): 346-51
- 68) Verwaal VJ, Kusamura S, Baratti D, et al. The eligibility for local-regional treatment of peritoneal surface malignancy. *J Surg Oncol.* 2008; 98 (4):220-3.
- 69) Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg.* 1995; 221 (1):29-42.



- 70) González-Moreno S, Kusamura S, Baratti D, et al. Postoperative residual disease evaluation in the locoregional treatment of peritoneal surface malignancy. *J Surg Oncol.* 2008; 98 (4):237-41.
- 71) Warrick, C. An improvement on the practice of a relief of symptoms, becomes an absolute cure for an ascites, exemplified in the case of Jane Roman: and Recommended to the consideration of the Royal Society, by Cristopher Warrick, of Truro, Surgeon. 1744, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.*, págs. 43, 12 -19.
- 72) Weisberger AS, Levine B, Storaasli JP. Use of nitrogen mustard in treatment of serous effusions of neoplastic origin. *J Am Med Assoc.* 1955; 159 (18):1704-7.
- 73) Green TH. Hemisulfur mustard in the palliation of patients with metastatic ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1959; 13 (4):383-93.
- 74) Suhrland LG, Weisberger AS. Intracavitary 5- Fluoracil in malignant effusión. *Arch Intern Med.* 1965; 116:431-3.
- 75) Spratt JS, Adcock RA, Sherrill W, et al. Hyperthermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res.* 1980; 40 (2):253-5.
- 76) Spratt JS, Adcock RA, Muskovin M, et al. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res.*

1980; 40 (2):256-60.

77) Dedrick RL, Myers CE, Bungay PM, et al. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat Rep.* 1978; 62 (1):1-11.

78) Iitsuka Y, Kaneshima S, Tanida O, et al. Intraperitoneal free cancer cells and their viability in gastric cancer. *Cancer.* 1979; 44 (4):1476- 80.

79) Speyer JL, Collins JM, Dedrick RL, et al. Phase I and pharmacological studies of 5-fluorouracil administered intraperitoneally. *Cancer Res.* 1980; 40 (3):567-72.

80) Sugarbaker PH, Gianola FJ, Speyer JC, et al. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluorouracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Surgery.* 1985; 98 (3):414-22.

81) Sugarbaker PH, Klecker RW, Gianola FJ, et al. Prolonged treatment schedules with intraperitoneal 5-fluorouracil diminish the local-regional nature of drug distribution. *Am J Clin Oncol.* 1986; 9 (1):1-7.

- 82) Elias D, Gilly F, Boutitie F, et al. Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (1):63-8.
- 83) Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, et al. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (20):3737-43.
- 84) González Moreno S, González Bayón L, Ortega Pérez G. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: methodology and safety considerations. *Surg Oncol Clin N Am*. 2012; 21 (4):543-57
- 85) Jacquet P, Stuart OA, Chang D, Sugarbaker PH. Effects of intra-abdominal pressure on pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin after intraperitoneal administration. *Anticancer Drugs*. 1996; 7 (5):596-603.
- 86) Esquis P, Consolo D, Magnin G, et al. High intra-abdominal pressure enhances the penetration and antitumor effect of intraperitoneal cisplatin on experimental peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg*. 2006; 244 (1):106-12.
- 87) Ortega-Deballon P, Facy O, Rat P. A “happy marriage” between open and closed techniques of heated intraperitoneal chemotherapy.

Cancer J. 2009; 15 (5):448.

88) Elias D, Antoun S, Raynard B, et al. Traitement des carcinomes péritonéales par exérèse complète et chimiohyperthermie intrapéritonéale. Étude de phase I-II permettant de définir la meilleure procédure technique. *Chirurgie* 1999; 124 (4): 380-389.

89) Coghlin C, Murray GI. Current and emerging Concepts in tumour metastasis. *J Pathol.* 2010; 222(1): 1-15

90) Nadal R, Lorente JA, Rosell R, et al. Relevance of molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer in the era of targeted therapies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013; 13 (3): 295-307.

91) Pierga JY, Bidard FC. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (21):7004-10.

92) Lim SH, Becker TM, Chua W, et al. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014; 346 (1):24-33.

- 93) Lianidou ES, Strati A, Markou A. Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014; 51 (3):160-71
- 94) Kin C, Kidess E, Poultsides GA, et al. Colorectal cancer diagnostic: biomarkers, cell-free DNA, circulating tumor cells and defining heterogeneous populations by single-cell analysis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2013; 13 (6):581-599.
- 95) Tralhao JG, Hoti E, Serodio M, et al. Perioperative tumor cell dissemination in patients with primary or metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2010; 36 (2):125-9.
- 96) Bork U, Rahbari NN, Schölch S, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer.* 2015; 112 (8):1306-13
- 97) Thorsteinsson M, Jess P. The clinical significance of circulating tumor cells in non-metastatic colorectal cancer- A review. *Eur J Surg Oncol.* 2011; 37 (6):459-465.
- 98) Nagrath S, Sequish LV, Maehswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.

Nature. 2007; 450 (7173):1235-9.

99) Monteiro J, Fodde R. Cancer Stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. Eur J Cancer. 2010; 46 (7):1198-203

100) Rahbari NN, Reissfelder C, Mühlbayer M, et al. Correlation of circulating angiogenic factors with circulating tumor cells and disease recurrence in patients undergoing curative resection for colorectal liver metastases. Ann Surg Oncol. 2011; 18 (8):2182-91.

101) Kaifi JT, Kunkel M, Junjia Z, et al. Circulating tumor cells are associated with diffuse Spreads in stage IV colorectal cancer patients. Cancer Biol Ther. 2013; 14 (12):1174-81.

102) Kuboki Y, Matsusaka S, Minowa S, et al. Circulating tumor cell (CTC) count and epithelial growth factor receptor expresión on CTCs biomarkers for Cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. Anticancer Res. 2013; 33 (9):3905-10.

103) Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer. 2004; 4 (6):558-56.

- 104) Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in a patient with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res.* 2002; 8 (7):2073-84.
- 105) Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, et al. Detection of EpCAM- Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol.* 2011: 252361.
- 106) Cristofanilli M. The biological information obtainable from circulating tumor cells. *Breast.* 2009; Suppl3: S38-40.
- 107) Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P. et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012; 14 (3): R71
- 108) Perou CM, Sorlie T Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406 (6797):747-52.
- 109) Serrano MJ, Nadal R, Lorente JA, et al. Circulating cancer cells in division in an early breast cancer patient. *Ann Oncol.* 2011; 22 (9):2150-51.
- 110) Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus Imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 (21): 6403-9.

- 111) Mohamed Suhaimi NA, Foong YM, Lee DY, et al. Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Mol Oncol.* 2015; 9 (4): 850-60
- 112) Igawa S, Gohda K, Fukui T, et al. Circulating Tumor cells as a prognostic factor in patients with small cell lung cancer. *Oncology lett.* 2014; 7 (5):1469-73.
- 113) Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, et al. Meta-Analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor-prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138 (5):1714-26.
- 114) Torino F, Bonmassar E, Bonmassar L, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer patients. *Cancer treat Rev.* 2013; 39 (7):759-72.
- 115) Seeberg LT, Waage A, Brunborg C, et al. Circulating tumor cells in patients with colorectal liver metastasis predict impaired survival. *Ann Surg.* 2015; 261 (1):164-71.



- 116) Lu CY, Uen YH, Tsai HL, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapsed. *Br J Cancer*. 2011; 104 (7):1178-84
- 117) Akagi Y, Kinugasa T, Adachi Y, et al. Prognostic significance of isolated tumor cells in patients with colorectal cancer in recent 10-year Studies (review). *Mol Clin Oncol*. 2013; 1 (4):582-92
- 118) Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009; 20 (7):1223-1229.
- 119) Gazzaniga P, Raimondi C, Nicolazzo C, et al. The rationale for liquid biopsy in colorectal cancer: a focus on circulating tumor cells. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015; 15 (7): 925-32.
- 120) Papavasiliou P, Fisher T, Kuhn J, et al. Circulating tumor cells in patients undergoing surgery for hepatic metastases from colorectal cancer. *Bayl Univ Med Cent*. 2010; 23 (1):11-14.
- 121) Tol J, Koopman M, Miller MC, et al. Circulating Tumor cells early predict progression free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol*. 2010; 21 (5):1006-1012.

122) Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, et al. Circulating Tumor cells as a potential biomarker in selecting patients for pulmonary metastasectomy from colorectal cancer: report a case. *Case Rep. Oncol* 2012; 5 (3): 542-45.

123) Kujawski R, Mik M, Przybylowska-Sygut K, et al. Circulating Tumor Cells In Colorectal Cancer. *Pol Przegl Chir.* 2015; 87 (5): 277-81.

124) Huang X, Gao P, Song Y, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2015; 15:202

125) Castro J, Ericsson C, Cashin P, et al. Preliminary Finding: Detection of Circulating Cancer Cells in Blood from a Patient with Peritoneal Carcinomatosis Treated with Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Chemotherapy. *Surgery Curr Res.* 2012; 2-3.

126) Ortega FG, Lorente JA, Ruiz MP, et al. miRNA in situ hybridization in circulating tumor cells—MishCTC. *Sci Rep.* 2015; 5:9207

