

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Estudio de microscopia electrónica de barrido en superficie peritoneal en controles y pacientes con cancer gástrico*

Ultrastructural changes of visceral peritoneum in patients with gastric cancer

Dr. PATRICIO BURDILES P.¹, Sra. NANCY OLEA R.², Drs. ATTILA CSENDES J.¹, GUILLERMO RENCORET P.¹, FRANCISCO PARADA C.¹, CARLOS CÁRCAMO I.¹, MAURICIO RECIO G.¹

¹Departamento de Cirugía, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago, Chile

²Jefa de Unidad de Microscopía Electrónica - CESAT, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

RESUMEN

Introducción: las metástasis peritoneales ocurren en más de la mitad de los pacientes con cáncer gástrico. Los mecanismos involucrados han sido poco estudiados y son pobremente conocidos. Experimentalmente se sabe que las células neoplásicas exfoliadas del tumor primario, sólo pueden implantarse y proliferar en áreas de peritoneo dañado o en áreas de denudación mesotelial. **Objetivos:** estudiar la ultraestructura peritoneal en controles y en pacientes con cáncer gástrico precoz y avanzado. **Material y Método:** Se estudiaron 14 pacientes con adenocarcinoma gástrico (4 mucosos/submucosos/musculares y 10 serosos) y 4 pacientes operados por patología benigna como controles. Se tomó muestra de peritoneo sano en la raíz del mesenterio (1,5 x 1,5 cm) y se obtuvo muestra de lavado peritoneal para estudio de células neoplásicas. Cada muestra fue fijada en glutaraldehído al 2,5%, deshidratada con acetona, secada y metalizada con oro-paladio. Se hizo evaluación ciega de cada muestra con Microscopía Electrónica de Barrido (10 campos con aumento de X 1250). Se excluyó pacientes con cirugía previa abdominal y con citología peritoneal (+) para células neoplásicas. **Resultados:** En el grupo control se encontró muy abundantes microvellosidades en la superficie y tenue definición de las uniones intercelulares (Normal). En casos con cáncer se observó disminución de las microvellosidades y pérdida de las uniones intercelulares (Patrón de Mosaico). Además se encontró pérdida de la estructura poligonal, aumento de la separación entre las células con pérdida focal de células mesoteliales dejando expuesta la lámina propia (Patrón de Denudación). Para cada grupo se encontró la siguiente distribución según patrones de normalidad, mosaico o denudación. Grupo control: 90,1%, 7,6% y 2,3% respectivamente. Grupo con cáncer mucoso/submucoso/muscular: 97,9%, 0% y 2,1% respectivamente. Grupo con cáncer seroso: 40,8%, 41,9% y 17,3% respectivamente ($p < 0,001$ comparado con los dos primeros grupos, test exacto de Fisher). **Conclusiones:** En pacientes con cáncer gástrico seroso, existe una significativa alteración del peritoneo visceral a distancia, expresado por la pérdida de la arquitectura normal y por denudación focal celular del mesotelio que es el requisito para la implantación metastásica. Esta alteración no se asocia con células cancerosas libres en

*Recibido el 18 de Agosto de 2006 y aceptado para publicación el 2 de Octubre de 2006.

Correspondencia: Dr. Patricio Burdiles P.

Santos Dumont 999, Independencia. Santiago, Chile

Fax: (562) 732 7245

e-mail: pburdiles@redclinicauchile.cl

la cavidad peritoneal y se plantea que estos cambios pueden expresar mecanismos necesarios que anteceden a la metastización peritoneal del adenocarcinoma gástrico.

PALABRAS CLAVE: *Carcinomatosis peritoneal, cáncer gástrico, implantes neoplásicos, microscopía electrónica.*

SUMMARY

Background: More than half of patients with gastric cancer have peritoneal metastases. Cancer cells exfoliated from the tumor can implant and proliferate in areas of damaged peritoneum or in areas of mesothelial denudation. **Aim:** To study peritoneal ultrastructure in patients with early and advanced gastric cancer. **Material and Methods:** Four patients with gastric cancer invading up to the muscular layer, 10 patients with gastric cancer invading the serosa and four patients operated for gastroesophageal reflux, were studied. A peritoneal sample from the root of the mesentery and a sample from peritoneal lavage, were obtained and analyzed by scanning electron microscopy. Patients with previous abdominal surgery or a positive peritoneal cytology for malignant cells, were excluded. **Results:** Among controls, abundant superficial microvilli and a faint definition on intercellular junctions was observed. In cancer patients, a reduction in microvilli and loss of intercellular junctions (mosaic pattern) or a loss of polygonal structure with focal loss of mesothelial cells, exposing the lamina propria (denudation pattern), were observed. A normal, mosaic or denudation pattern was observed in 90.1%, 7.6% and 2.3% of controls respectively, in 98,0 and 2% of patients with cancer invading up to the muscular layer respectively and 41, 42 and 17% of patients with cancer invading the serosa respectively ($p < 0.001$ compared with the former two groups). **Conclusions:** Among patients with gastric cancer that invades the serosal surface, the visceral peritoneum experiences a loss of normal architecture and focal cellular denudation. These changes are not associated with the presence of free cancer cells in the peritoneal cavity and may precede the appearance of peritoneal metastases.

KEY WORDS: *Gastric cancer, peritoneum, peritoneal invasion, electron microscopy.*

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la principal causa de muerte por tumores malignos en Chile, particularmente entre varones mayores de 45 años presentando una tasa anual de veinte fallecidos por 100.000 habitantes. Este problema de salud se traduce en alrededor de 3680 egresos hospitalarios anuales y algo más de 3180 pacientes fallecidos por esta neoplasia cada año¹. A diferencia de Japón, en Occidente la mayoría de los casos se presentan en sus formas avanzadas y se estima que al menos la mitad de estos pacientes presentan enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico médico². Tan sombrío como lo anterior es el hecho que del total de pacientes exitosamente resecados con potencial curación (R0), el 50%-60% fallecerá por progresión de la enfermedad, expresándose principalmente como metástasis al peritoneo y a otros órganos³. La carcinomatosis peritoneal es extremadamente ominosa pues estos pacientes fallecen en pocos meses con nula sobrevida alejada y hasta la fecha no hay terapia útil para su curación. Los mecanismos de diseminación de las células tumorales a través de la vía linfática y hematogena han sido ampliamente estudiados⁴, en cambio los mecanismos por los cuales ocurren las metástasis

peritoneales son pobremente comprendidos y han sido escasamente estudiados. Experimentalmente, se ha demostrado que las células cancerosas libres en la cavidad peritoneal no adhieren a peritoneo indemne, pero que tienen gran afinidad por la lámina propia de áreas denudadas de la superficie peritoneal y que esta pérdida de células mesoteliales es requisito previo para la implantación de células neoplásicas infundidas en la cavidad peritoneal^{5,6}. En seres humanos, se ha demostrado que el peritoneo es normal en pacientes con cáncer gástrico que no compromete la serosa del órgano, pero que la superficie peritoneal sufre alteraciones que llevan a la exfoliación de células mesoteliales en pacientes con cáncer gástrico que infiltra la serosa, aún cuando todavía no muestran evidencias de metástasis al peritoneo. Más importante todavía, el implante de células cancerosas en el peritoneo ocurre, al igual que en los modelos experimentales, en áreas alteradas de éste⁷. Sin embargo, el mecanismo por el que ocurriría este fenómeno no se conoce y se ha postulado en modelos experimentalmente, que la presencia de células cancerosas en el peritoneo podría inducir los cambios mesoteliales⁶, hecho que no ha sido estudiado en seres humanos.

El microscopio electrónico en particular me-

diante la técnica de barrido, permite la observación detallada de la superficie mesotelial normal y de sus sutiles alteraciones, observación que es imposible de realizar con el microscopio óptico^{6,7} por el nivel de resolución y aumento óptico requerido.

La importancia de estudiar factores relacionados a los mecanismos de diseminación al peritoneo de los cánceres digestivos y especialmente del cáncer gástrico, radica en la posibilidad de contribuir al conocimiento de esta enfermedad, mejorar el catastrófico pronóstico de esta fase de la neoplasia y de eventualmente contribuir a la prevención de esta letal complicación.

El objetivo de este estudio fue en primer término, adquirir experiencia y protocolizar el estudio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) en peritoneo humano, y en segundo término, estudiar y describir las características de este peritoneo en sujetos control y en pacientes con cáncer gástrico según grado de penetración tumoral en la pared gástrica (etapa precoz/intermedia o avanzada), tipo de cáncer según Lauren y área del tumor primario. Se consideró realizar el estudio en ausencia de células cancerosas libres en cavidad peritoneal y de metástasis macroscópicas peritoneales o de cualquier otro órgano, puesto que este aspecto no ha sido previamente reportado.

MATERIAL Y MÉTODO

El presente estudio fue definido como una investigación descriptiva de corte transversal en seres humanos, con casos de adenocarcinoma gástrico y controles. Se realizó entre Octubre del año 2002 y Diciembre del año 2004.

Pacientes estudiados: Se consideró estudiar 32 muestras compuestas de 10 pacientes elegidos como controles, 10 pacientes con adenocarcinoma gástrico no seroso, es decir precoz o intermedio (compromiso de capa mucosa, submucosa o muscular propia) y 12 pacientes con adenocarcinoma gástrico con compromiso de la serosa a la laparotomía, pero sin evidencias de compromiso peritoneal macroscópico. Para reducir los factores de confusión, fueron considerados como criterios de exclusión, el antecedente de cirugía abdominal previa (abierta o laparoscópica) o de trauma abdominal cerrado, antecedentes de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Fiebre Tifoidea, Colecistitis crónica litiasica y cualquier otra enfermedad de índole similar que pudiera causar alteraciones peritoneales.

a) *Pacientes neoplásicos:* Todos los pacientes tenían estudio endoscópico y de biopsia preoperatoria que confirmaba la presencia de un adenocarcinoma gástrico. Todos los pacientes fueron

etapificados mediante exhaustiva evaluación clínica y de laboratorio para definir su estado fisiológico, desempeño general y condición clínica para ser sometidos a gastrectomía con criterio oncológico. Además fueron etapificados mediante Tomografía Axial Computada (TAC) multicorte abdominal realizada en nuestro Departamento de Diagnóstico por Imágenes, cuyo resultado fue evaluado para descartar la presencia de ascitis, metástasis hepáticas o evidencias de metástasis peritoneales. Cualquiera de estos hallazgos fue considerado criterio de exclusión. Además se estudió el tórax con radiografía frontal y lateral para descartar metástasis pulmonares.

La clasificación definitiva de los casos con cáncer se basó en el informe final del Anatómopatólogo de la pieza extirpada. Uno de los criterios del tipo histológico se basó en la Clasificación de Lauren que los distingue en tipo Intestinal o Difuso.

El área tumoral se definió mediante el producto del diámetro más grande y su diámetro perpendicular.

b) *Pacientes controles:* Los sujetos control fueron seleccionados al azar entre pacientes con Enfermedad por Reflujo gastroesofágico Crónico con indicación de cirugía debido a la mala respuesta al manejo médico, y pareados en rango etario respecto al grupo en estudio.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para su incorporación a este protocolo.

Método: se aplicó el siguiente protocolo para cada fase.

a) *Obtención de la muestra:* los pacientes y los controles fueron sometidos a anestesia general. Una vez abierta la cavidad peritoneal, y habiéndose descartado metástasis tumorales o ascitis a la inspección, se procedió a obtener una muestra de peritoneo de la raíz del mesenterio de 1,5 x 1,5 cm con disección extremadamente cuidadosa intentando resecar una delgada capa de 1 mm de grosor y manipulación fina de los bordes para no causar daño en el centro de la muestra e inmediatamente fueron lavadas suavemente por inmersión, con solución salina al 0,9%. Las primeras 3 muestras fueron sometidas a extensión y sujeción con alfileres a lámina de plástico pero se vio al final del proceso, que este método causaba un evidente efecto "artefacto" por deformación por lo que consecuentemente, las siguientes muestras se extendieron sin sujeción sobre lámina cubre-objeto de vidrio. De inmediato las muestras fueron sumergidas en glutaraldehído 2,5% tamponado a pH 7,4 con Fos-

fato 0,1 M en frasco individual sellado e identificado con código alfa-numérico. A continuación, se procedió a infundir 500 ml de Solución Salina al 0,9% en la cavidad peritoneal y se agitó suavemente para su homogénea distribución. Luego se envió una muestra de 60 mL a laboratorio para estudio inmediato por centrifugado para pesquisa de células neoplásicas libres. En caso de resultar (+), se consideró criterio de exclusión (2 casos) ya que experimentalmente la sola presencia de estas células parece inducir la alteración.

b) *Preparación de las muestras para microscopia electrónica de barrido:* Una vez en el laboratorio de Microscopia Electrónica, las muestras se dejaron en fijación en solución de glutaraldehído 2,5% tamponado a pH 7,4 con Fosfato 0,1 M. por 24-48 horas y luego fueron sometidas a proceso de deshidratación con Acetona. Posteriormente fueron sometidas a secado por punto crítico (Equipo Polaron, England), montaje en soporte ad-hoc y finalmente sometidas a fase de metalizado con Oro y Paladio (Metalizador Polaron 5000, England).

c) *Análisis de las muestras en microscopio electrónico:* el estudio de cada muestra se realizó en Microscopio Electrónico de Barrido (Zeiss DSM-940, Germany) de la Unidad de Microscopia Electrónica (CESAT), Instituto de Ciencias Bio-Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Cada observación fue realizada por uno de los autores (N.O.R.) en forma de "simple ciego" sin conocer la nominación de caso o control. El análisis se realizó sobre la lectura de campos escogidos al azar en el centro de la muestra de modo de no trabajar en áreas potencialmente expuestas a la manipulación quirúrgica durante la fase de obtención. Se observó secuencialmente 10 campos de aumento X 1250 que permitió apreciar 30 a 36 células por cada campo (300-360 células observadas por cada muestra). Los resultados se expresan en porcentaje de cada patrón sobre el total de células observadas en cada muestra.

d) *Criterios de ultraestructura a estudiar:* se consideró la observación de las características de los patrones celulares y de la arquitectura mesotelial según Kiyasu⁷. De las características celulares se registró la presencia normal o pérdida de microvellosidades, la morfología celular de tipo plana poligonal o su tendencia a hacerse más esféricas o cilíndricas ("balonamiento"). De las características arquitecturales, se registró la presencia de estrechas uniones intercelulares, la pérdida en grado variable pero evidente, de estas uniones (Mosaico) y la aparición de exfoliación mesotelial expresada por la pérdida parcelar de células mesoteliales que dejaban áreas de lámina propia desnuda (Denudación).

e) *Análisis estadístico:* Para comparar proporción de patrones entre los grupos, se usó el método de tablas de contingencia asumiendo criterios de variables dicotómicas, mediante Test exacto de Fisher.

Para comparar valores porcentuales individuales entre muestras de cada grupo se usó test de Mann-Whitney (rank-sum test) para grupos no pareados con distribución asimétrica (no Gaussiana).

Para analizar la relación entre dos variables se usó el modelo de regresión lineal.

Se consideró un nivel de significación estadística con $p < 0,05$.

RESULTADOS

De 32 muestras originalmente planificadas para este estudio, se desechó 14 por problemas detectados en la fase final de evaluación por MEB. En 3 muestras iniciales se observó excesivo estiramiento al preparar la muestra (alfileres para sujeción) lo que causó severas alteraciones morfológicas de la superficie celular que hicieron no recomendable incluirlas en el análisis (Figura 1). Esto llevó a sistematizar la disposición de la muestra sobre un cubre-objeto de vidrio sin elementos de sujeción. De igual modo, a lo largo de todo el estudio debió desecharse 7 muestras por advertir en la observación al MEB, extensas áreas de micro-desgarros que se atribuyeron a inadvertida pero excesiva tensión durante la manipulación. Otras 4 muestras sufrieron diversos grados de extracción de material celular de la superficie mesotelial por exceso de fijación, que provocó la exposición del cito-esqueleto.

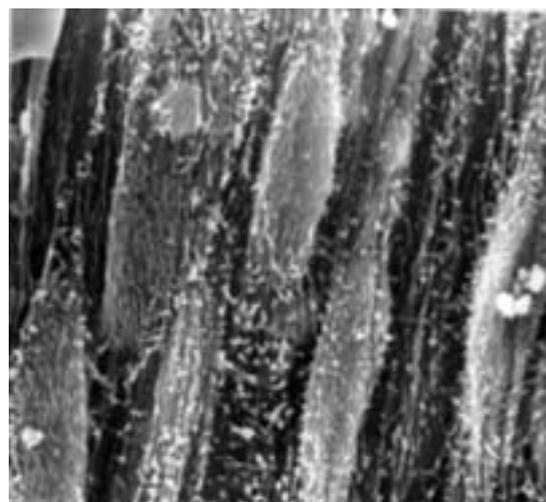


Figura 1. Imagen debida a excesivo estiramiento de la muestra para sujeción. Se observa células muy elongadas y separadas entre si.



Figura 2. Muestra sometida a 48 horas de fijación en Glutaraldehído 2,5%. Se observa extensas áreas de extracción celular, dejando la lámina propia denudada. En la parte central se aprecia pérdida de esta lámina, exponiendo fibras del tejido conectivo sub-mesotelial.

to y de fibras del tejido conectivo submesotelial (Figura 2), lo que permitió definir con precisión el tiempo óptimo de fijación (24 horas). Estos inesperados obstáculos fueron elocuente señal de lo difícil que es trabajar con este tejido para el tipo de estudio propuesto. Las 18 muestras que finalmente satisficieron todos los criterios para esta investigación conforman la base de este estudio y sobre ellas se reportan los resultados.

El grupo de pacientes desde los cuales se analizaron estas 18 muestras estaba compuesto



Figura 3. Patrón de Normalidad. Superficie peritoneal con abundantes micro-vellosidades y muy tenue demarcación de las uniones inter-celulares.

por 4 mujeres y 10 varones y los sujetos control eran 1 mujer y 3 hombres. La edad promedio del grupo fue de 63,7 años (\pm DS 12,4) con rango entre 39 y 80 años. El grupo de pacientes con cáncer no seroso estaba compuesto por 2 casos de cáncer mucoso, un cáncer submucoso y un cáncer muscular. Todos los pacientes fueron sometidos a gastrectomía total radical D2, en dos casos con esplenectomía, y reconstitución esófago-yeyunal con asa en Y de Roux y anastomosis circular mecánica. No hubo morbilidad ni mortalidad en la serie.

El análisis de las muestras control mostró un patrón de celularidad muy uniforme, con células cubiertas con microvellosidades extraordinariamente abundantes, distribuidas homogéneamente en toda la superficie. La morfología celular fue exclusivamente plana y con uniones intercelulares apenas distinguibles, lo que fue definido como Patrón de Normalidad (Figura 3).

Un segundo tipo de patrón consistió en la notoria disminución de microvellosidades, tendencia al balonamiento celular y evidente separación entre las células conformando un aspecto de Mosaico (Figura 4).

El tercer tipo de patrón se definió por la pérdida focal de células mesoteliales dejando expuesta áreas de lámina propia que denominamos Patrón de Denudación, y que estuvo siempre asociado a gran atrofia de microvellosidades y grados variables de pérdida de las uniones intercelulares con marcada separación entre las células (Figura 5).

En la Tabla 1 se resumen los hallazgos de los tres tipos de patrones en los tres subgrupos en

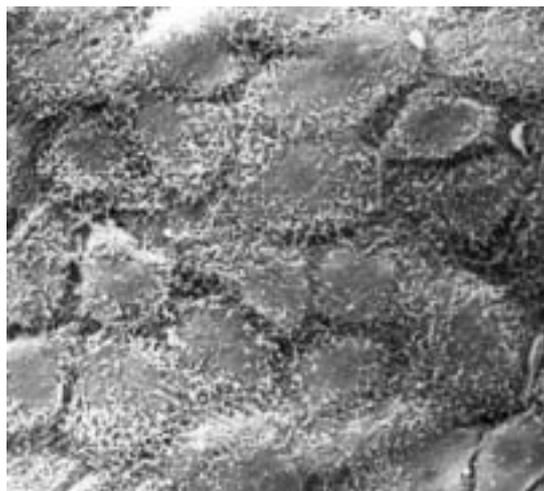


Figura 4. Patrón de Mosaico. Se observa marcada atrofia de las micro-vellosidades especialmente en el centro de las células y notoria separación entre ellas.

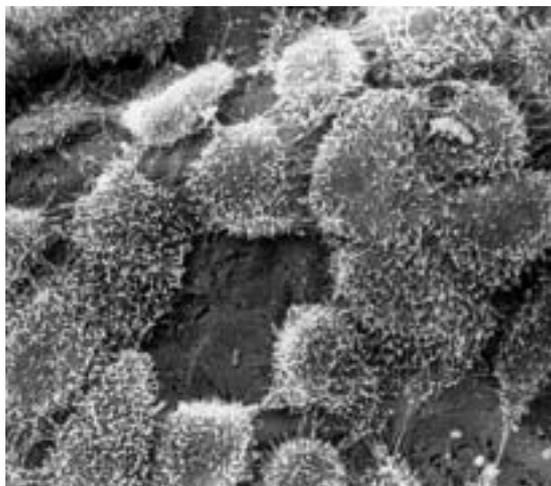


Figura 5. Patrón de Denudación. El hallazgo más representativo es la pérdida focal de algunas células, que dejan expuesta la lámina propia. Además este fenómeno se acompaña siempre en sus vecindades de alteraciones tipo patrón de Mosaico.

estudio. Se aprecia que en los grupos control y de cáncer no seroso, predominó en más del 90% de las observaciones el patrón normal y menos del 3% del total mostró patrón de denudación. Al contrario, en el grupo con cáncer seroso, se observa un significativo predominio del patrón de mosaico (41,9%) y un significativo aumento del patrón de denudación (17,3%), estando el patrón normal en promedio en menos de la mitad de las observaciones.

En la Tabla 2 se muestra la distribución proporcional sobre el total de células estudiadas en cada muestra cuando los pacientes con carcinoma seroso (n=10) se subdividieron en Intestinal (n=5) o Difuso (n=5) de acuerdo a la clasificación de Lauren. En el subgrupo de pacientes con cáncer de tipo Intestinal predominó en forma marginalmente significativa el patrón de normalidad en el 55,6% del total de células estudiadas (intervalo de confianza de 95%= 26,3-85,8; p=0,05 Test de Mann-Whitney al compararlo con el patrón de Mosaico o

el patrón de Denudación del mismo subgrupo) ocupando los dos patrones restantes similar proporción de 22%. En cambio, en el subgrupo de pacientes con cáncer de tipo difuso, sólo el 12,4% del recuento celular presentaba el patrón de normalidad, predominando significativamente el patrón de Mosaico con un 71,5% (IC 95%= 56,5-87,5; p=0,007 Test de Mann-Whitney) y siendo 16,1% el patrón de denudación. En otras palabras, en el subgrupo de pacientes con cáncer de tipo difuso, el peritoneo visceral se encuentra alterado en más del 85% de su superficie a la Microscopía electrónica, a pesar de parecer normal a la inspección quirúrgica.

En la Figura 6 se observa la relación entre el área tumoral y el patrón de mosaico observados en cada muestra de los 10 cánceres que alcanzaban la serosa gástrica, según modelo de regresión lineal. Se aprecia que la dispersión de los valores es grande y no muestra una correlación con el área tumoral.

En la Figura 7 se observa la relación entre el área tumoral y el patrón de denudación en las mismas muestras de cáncer seroso. Los valores se muestran dispersos sin una tendencia definida. En este caso, la relación aparece levemente inversa, pero su valor no es significativo (p=0,49).

En ambos análisis se aprecia que no existe una tendencia definida de ninguna de las dos variables estudiadas y que el área tumoral no permite predecir el incremento o disminución de los dos patrones analizados.

DISCUSIÓN

El interés de la diseminación cancerosa en el peritoneo es tan antiguo como los intentos quirúrgicos por curar los cánceres digestivos. Ya temprano en el siglo XX, Jones y colaboradores⁸ describieron la especial afinidad de las células tumorales exfoliadas desde cánceres digestivos (estómago, colon, páncreas) para implantarse en zonas injuriadas de la superficie peritoneal. Debido a la dificultad de diferenciar la implantación de células tumorales en la cavidad peritoneal de células mesoteliales inflama-

Tabla 1
PROMEDIO DE PROPORCIÓN DE PATRONES EN CADA GRUPO

Grupo	n	Normal	Mosaico	Denudación
Control	4	90,1% (85-97%)	7,6% (0-21%)	2,3% (0-3%)
Ca. No Seroso	4	97,9% (94-100%)	—	2,1% (0-6%)
Ca. Seroso	10	40,8% (0-75%)*	41,9% (0-89,5%)*	17,3% (0-81,1%)*

*p<0,0001. Cáncer seroso comparado con los otros grupos.
Test exacto de Fisher.

Tabla 2
PROPORCIÓN DE PATRONES EN PACIENTES CON
CÁNCER SEROSO SEGUN TIPO
HISTOLÓGICO DE LAUREN

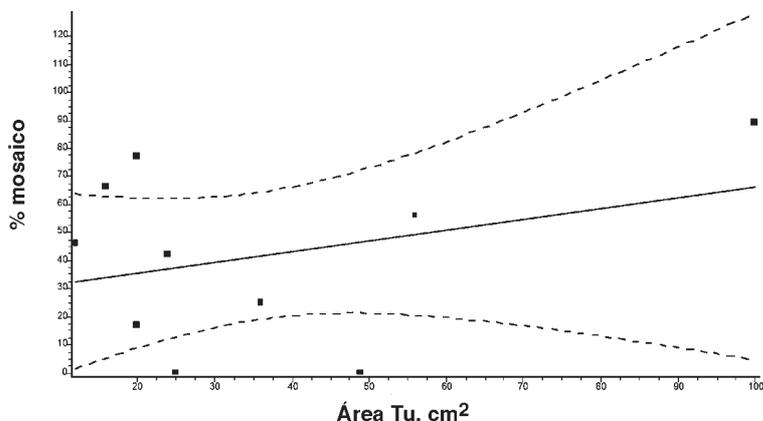
Lauren	n	Normal	Mosaico	Denudación
Intestinal	5	55,6%*	22,4%	22,0%
Difuso	5	12,4%	71,5%**	16,1%

*p= 0,05 respecto de los otros grupos. Mann-Whitney U test.

**p=0,007 respecto de los otros grupos. Mann-Whitney U test.

das, Birbeck y Wheatley⁵ fueron los primeros en estudiar mediante microscopia electrónica la micromorfología de este fenómeno, infundiendo células tumorales de líneas celulares de cultivo en la cavidad peritoneal de ratas. Sus hallazgos reportaban alteraciones en la morfología de las células mesoteliales, cambiando desde su clásica forma achatada con microvellosidades e íntimo contacto con sus similares adyacentes, a una forma cilíndrica o balonada, con pérdida de las microvellosidades y más importante aún, con pérdida de la adhesión intercelular. Este estudio sugirió que existía un posible efecto de exfoliación mesotelial asociado a la presencia de células tumorales en la cavidad peritoneal y una muy especial afinidad de estas células tumorales por áreas de peritoneo denudadas de mesotelio, observando que el fenómeno de adhesión y penetración de las células malignas en la membrana basal o lámina propia denudada ocurre entre el 7º y el 9º día de la infusión intraperitoneal. Posteriormente Buck⁶ en 1973, utilizando un modelo experimental también en ratas, demostró categóricamente que las células tumorales infundidas no adhieren a peritoneo sano, en cambio se adhieren y proliferan fácilmente en peri-

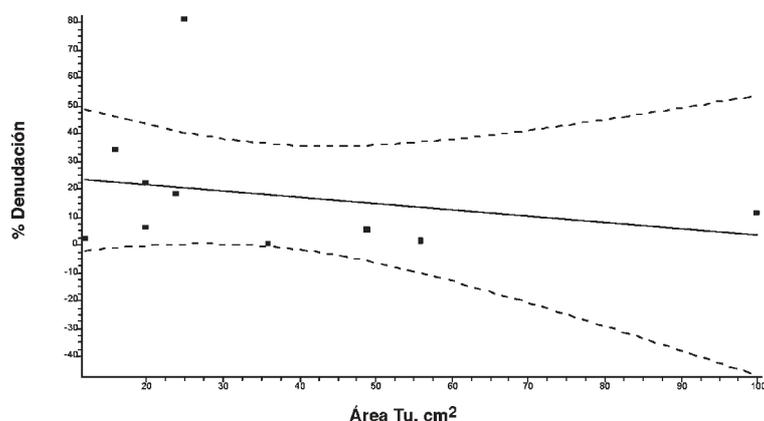
toneo previamente injuriado. En 1981, investigadores japoneses⁷ publicaron el primer estudio de microscopia electrónica en metástasis peritoneales en humanos, evaluando 34 pacientes con cáncer gástrico sometidos a cirugía. Estos autores reportaron cambios evidentes en la superficie peritoneal del mesenterio en 56% de pacientes sin metástasis cuyo cáncer comprometía la serosa gástrica y estos mismos cambios estaban presentes en el 89% de los pacientes que presentaban metástasis peritoneales macroscópicas. Lo llamativo de este estudio es que los autores no encontraron estas alteraciones en aquellos pacientes con cánceres precoces o intermedios, es decir, en los cuales el tumor no había alcanzado la serosa del estómago, sugiriendo que los cambios en la superficie peritoneal preceden a los implantes metastásicos. Sin embargo, estos autores no estudiaron la presencia o ausencia de células neoplásicas libres en la cavidad peritoneal, hecho muy importante ya que en los estudios experimentales previamente citados, especialmente en el estudio de Birbeck, se sugiere que su sola presencia podría inducir estos cambios. Nuestro estudio intentó despejar esa interrogante al efectuar la selección de los casos excluyendo aquellos que tuvieran células neoplásicas presentes en el estudio de centrifugado del líquido peritoneal en el momento de la laparotomía. En forma similar con el estudio de Kiyasu⁷, nuestros casos control y pacientes con cáncer gástrico que no compromete la serosa, muestran una morfología normal del peritoneo visceral en alrededor del 90% del total de área de células estudiadas, en cambio casi el 60% de la superficie peritoneal estudiada en nuestros pacientes con cáncer seroso mostró alteraciones del tipo atrofia de microvellosidades, separación celular y exfoliación mesotelial focal. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por Kiyasu⁷, en nuestro estudio



Pendiente de 0,38 (coeficiente de correlación de 0,33).

Entre las líneas achuradas se grafica el área del intervalo de confianza de 95% p=0,35.

Figura 6. Relación entre el área tumoral y el patrón de mosaico en cáncer seroso. Modelo de Regresión lineal.



Pendiente de -0,22 (coeficiente de correlación de -0,24).

Entre las líneas achuradas se grafica el área del intervalo de confianza de 95% $p=0,49$.

Figura 7. Relación entre el área tumoral y el patrón de denudación en cáncer seroso. Modelo de Regresión lineal.

se pudo identificar en los controles y en las muestras de cáncer no seroso, algunas de las alteraciones más distintivas de los casos con cáncer seroso, es decir, patrones de Mosaico y de Denudación, aunque en una baja proporción (<10%) del total del área estudiada en cada muestra.

No está claramente entendido el fenómeno por el cual las células neoplásicas exfoliadas desde el tumor primario pueden permanecer viables por un lapso de tiempo a pesar de no tener un mecanismo nutricional directo. Se ha investigado los mecanismos de supervivencia de las células neoplásicas libres en la cavidad peritoneal reportando algunos factores proteicos que participan de la inhibición de la apoptosis en dichas células durante el proceso de diseminación peritoneal⁹. Es interesante que al estudiar la capacidad de células neoplásicas de sobrevivir en el torrente sanguíneo, investigadores han reportado que sólo subpoblaciones celulares son capaces de mantener su viabilidad a 24 horas de su infusión, lo que sugiere que la capacidad de metastatizar no es un fenómeno al azar sino que probablemente pertenece a sólo unas pocas células tumorales y está regido por factores biológicos precisos pero cuya intimidad e identidad está aún por develarse¹⁰.

Otra línea de investigación experimental ha reportado la capacidad de algunos tipos de células tumorales gástricas de adherir e implantarse en el peritoneo de ratas, encontrando una sobre-expresión de proteínas del tipo integrinas que permiten su adhesión a algunos componentes de la matriz extracelular submesotelial, como fibronectina, laminina y colágeno tipo I. Más aún, al neutralizar estas integrinas con anticuerpos específicos, prácticamente se elimina el potencial de implantación de estas células¹¹. Otro mecanismo que parece

disminuir significativamente esta capacidad de adhesión de células tumorales en modelos experimentales en ratas, es la aplicación de ciertos fosfolípidos intraperitoneales que actuando como simple barrera biológica, impedirían la adherencia e implantación de células libres a elementos de la lámina propia en el peritoneo dañado¹².

Todas estas evidencias experimentales favorecen la hipótesis que las células peritoneales libres exfoliadas desde un tumor maligno gástrico en la cavidad peritoneal requieren denudación previa del mesotelio peritoneal para poder adherirse a las proteínas de la lámina propia.

Desde el punto de vista clínico, la implantación secundaria en la cicatriz de la laparotomía en pacientes operados por cáncer gástrico no es un hecho frecuente de observar ni menos reportado en detalle. Conceptualmente, todo paciente operado por cáncer digestivo representa un modelo de daño peritoneal y de eventual diseminación de células neoplásicas por manipulación quirúrgica, que podría verse afectado de implantación metastásica en la cicatriz del acceso quirúrgico (laparotomía, contrabertura de drenajes, sitios de trócares en laparoscopia). Sin embargo esta es una complicación mas bien rara cuando se analiza en el contexto de las evidencias científicas y en casos de cáncer de colon o cáncer de vesícula biliar, como implante único ha sido reportado en menos del 1% de los casos en riesgo¹³.

Finalmente, en nuestro estudio no encontramos evidencias de que la magnitud de la alteración peritoneal expresada como proporción de superficie anormal, se correlacione con el área del tumor primario. Pero si encontramos un significativo incremento de las alteraciones de la superficie mesotelial en los pacientes con cáncer seroso de tipo

intestinal (44%) y más aún en los pacientes con cáncer de tipo difuso (88%) de la clasificación de Laurén, hecho que coincide con la mayor tendencia de este último subtipo de adenocarcinoma de metastizar al peritoneo¹⁴, complicación que representa la principal causa de inoperabilidad e irresecabilidad de nuestros pacientes ya que determina un muy rápido desenlace desde el momento del diagnóstico¹⁵.

El significado de estas alteraciones es aún materia de especulación, pero el hecho que el fenómeno se encuentre tanto en controles como en los pacientes con cáncer gástrico orienta a una alteración de tipo cuantitativo más que a un fenómeno del tipo todo o nada. Su mecanismo gatillador podría estar relacionado con el crecimiento del tumor hasta la serosa del estómago y abre nuevas áreas de interés en la investigación del cáncer gástrico.

Nota: este trabajo fue financiado a través de fondos concursables, por la Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica (OAIC) del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, mediante Grant OAIC N° 043/02.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud, Departamento de Estadísticas e Información de Salud, Estadísticas Vitales y de Morbilidad 2001-2002.
2. Hundahl SA, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of US Gastric Carcinoma Patients treated with gastrectomy: fifth edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. *Cancer* 2000; 88: 921-932.
3. Roviello F, Marrelli D, de Manzoni G, Morgagni P, Di Leo A, Saragoni L, *et al.* Prospective study of peritoneal recurrence after curative surgery for gastric cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 1113-1119.
4. Schwartz GK. Invasion and metastases in gastric cancer: *in vitro* and *in vivo* models with clinical correlations. *Seminars in Oncology* 1996; 23: 316-324.
5. Birbeck MSC y Wheatley DN. An Electron Microscopic Study of the Invasion of Ascites Tumor Cells into the Abdominal Wall. *Cancer Research* 1965; 25: 490-497.
6. Buck RC. Walker 256 Tumor Implantation in Normal and Injured Peritoneum Studied by Electron Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Autoradiography. *Cancer Research* 1973; 33: 3181-3188.
7. Kiyasu Y, Kaneshima S y Koga S. Morphogenesis of Peritoneal Metastasis in Human Gastric Cancer. *Cancer Research* 1981; 41: 1236-1239.
8. Jones FS y Rous P. On the cause of the localization of secondary tumors at points of injury. *J Experimental Med* 1914; 20: 404-412.
9. Yawata A, Adachi M, Okuda H, Naishiro Y, Takamura T, Hareyama M, *et al.* Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene* 1998; 16: 2681-2686.
10. Fidler IJ. Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research* 1990; 50: 6130-6138.
11. Nishimura S, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M. Role of $\alpha 2\beta 1$ - and $\alpha 3\beta 1$ -integrin in the peritoneal implantation of scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 1406-1412.
12. Jansen M, Treutner KH, Jansen PL, Zuber S, Otto J, Tietze L, *et al.* Inhibition of Gastric Cancer Cell Adhesion in Nude Mice by Intraperitoneal Phospholipids. *World J Surg* 2005; 29: 708-714.
13. Ziprin P, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. The Theories and Realities of Port-Site Metastases: A Critical Appraisal. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 395-408.
14. Sarbia M, Becker KF, Höfler H. Pathology of Upper Gastrointestinal Malignancies. *Semin Oncol* 2004; 31: 465-475.
15. Burdiles P, Piña R, Musleh M, Csendes A, Díaz J, Maluenda F y cols. Sobrevida en pacientes con cáncer gástrico no resecaados. LXXIII Congreso Chileno de Cirugía, 19-23 Noviembre 2000, Pucón, Chile. *Revista de Resúmenes*, 90-91.