

Trabajo de Fin de Grado
Grado en Medicina

Efecto de la hepatectomía parcial sobre el desarrollo de metástasis hepáticas:

revisión bibliográfica y estudio experimental en un modelo murino.

Autor:

Mikel González Arribas

Director:

Dr. Borja Herrero de la Parte

Co-Director:

Dr. Alexander González Bada

Leioa, Abril de 2.018

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CÁNCER COLORRECTAL	1
1.1.1. <i>Epidemiología.....</i>	<i>1</i>
1.1.2. <i>Etiopatogenia.....</i>	<i>2</i>
1.2. METÁSTASIS HEPÁTICAS	8
1.2.1. <i>Tratamiento quirúrgico de las MHCCR.....</i>	<i>9</i>
1.2.2. <i>Micrometástasis.....</i>	<i>9</i>
1.3. REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	12
1.3.1. <i>Fases de la regeneración hepática.....</i>	<i>13</i>
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
3.2. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1.1. <i>Criterios de búsqueda.....</i>	<i>17</i>
4.1.2. <i>Criterios de inclusión y exclusión.....</i>	<i>18</i>
4.2. TRABAJO EXPERIMENTAL.....	19
4.2.1. <i>Animales de experimentación</i>	<i>19</i>

4.2.2.	<i>Cultivos celulares.....</i>	19
4.2.3.	<i>Inoculación celular.....</i>	20
4.2.4.	<i>Procesamiento de la muestra.....</i>	21
5.	RESULTADOS.....	23
5.1.	RESULTADOS REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	23
5.1.1.	<i>Factor de crecimiento hepatocitario.....</i>	24
5.1.2.	<i>Factor de crecimiento transformante β.....</i>	25
5.1.3.	<i>Factor de crecimiento endotelial vascular.....</i>	26
5.1.4.	<i>Receptor del factor de crecimiento epidérmico.....</i>	27
5.1.5.	<i>Factor de crecimiento de insulina I.....</i>	27
5.1.6.	<i>Factor de necrosis tumoral.....</i>	28
5.1.7.	<i>Metaloproteinasas de la matriz.....</i>	29
5.2.	RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	30
6.	DISCUSIÓN.....	33
6.1.	MODELO DE INDUCCIÓN DE METÁSTASIS HEPÁTICAS.....	33
6.2.	EFFECTO DE LA RH PARCIAL SOBRE EL DESARROLLO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS.....	35
6.2.1.	<i>CONTROL DE LAS RUTAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS.....</i>	36
7.	CONCLUSIONES.....	38
8.	BIBLIOGRAFIA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen del CCR.	2
Figura 2. Cambios estructurales y moleculares durante la regeneración hepática y la recurrencia de las micrometástasis residuales. Tomado de Christophi et al., 2008. ...	11
Figura 3. Interacciones celulares durante el proceso de regeneración hepática.....	12
Figura 4. Fases de la regeneración hepática tras la resección hepática. Tomado de Christophi et al., 2008.....	13
Figura 5. Imagen representativa de uno de los lóbulos hepáticos seccionados para realizar las medidas de área total hepática (sombreado en verde y delimitado por la línea discontinua roja) y área colonizada por metástasis (sombreado en verde y delimitado por línea discontinua negra).....	22
Figura 6. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie total hepática invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).....	30
Figura 7. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie del LLD invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).....	31
Figura 8. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie del LC invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).....	31
Figura 9. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie del LPM invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Moléculas implicadas en los procesos de regeneración hepática tras una RH y en el desarrollo de metástasis.	23
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) constituye una proporción significativa de la carga global de morbilidad y mortalidad asociada al cáncer, particularmente en países desarrollados donde éstas neoplasias ocupan el segundo lugar en términos de incidencia y mortalidad, en comparación con el quinto en países menos desarrollados (1).

Incluso después de una cirugía potencialmente curativa, en torno al 25-30% de los pacientes con CCR presentarán metástasis hepáticas de CCR (MHCCR) en algún momento de la evolución de la enfermedad, lo que demuestra que la diseminación de tumores primarios a órganos distantes suele ser el aspecto limitante de la vida en pacientes con carcinoma colorrectal (2).

1.1.1. Epidemiología

El cáncer es un importante problema tanto en términos de salud pública, independientemente del grado de desarrollo del país (3), siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) cifró el número de casos de cáncer en, aproximadamente, 14 millones, esperándose que el número de casos aumente un 70% en las próximas dos décadas (4). El CCR, en concreto, es el tercer tipo de cáncer más frecuente en varones y el segundo más frecuente en mujeres. Aproximadamente el 55% de los casos ocurren en los países desarrollados, aunque con importantes variaciones (3). Las altas tasas de recurrencia tumoral después de la resección quirúrgica en pacientes con MHCCR se han relacionado con la regulación positiva de los factores de crecimiento necesarios para la regeneración hepática (5).

A nivel europeo, en el año 2014, casi 153.000 personas murieron como consecuencia directa del CCR, lo cual equivale al 11,3% de todas las muertes por cáncer y el 3,1% del total de muertes. En la mayoría de los Estados miembros de la Unión Europea (UE), la proporción de muertes por CCR fue mayor para los hombres que para las mujeres.

explica más adelante). Ésta incidencia muestra una gran variabilidad en función de la región geográfica, llegando, incluso, a no encontrarse diferencias en aquellas regiones donde la tasa de incidencia del CCR es baja (3).

1.1.2.3. Historia familiar

Pese a que la mayoría de los pacientes con CCR no presentan en su familia antecedentes de esta enfermedad, entre un 15-20% de los individuos con CCR si tienen al menos un familiar afectado (16).

Hunter et al., en 1994, realizaron un estudio prospectivo para evaluar la importancia de la historia familiar en la incidencia del CCR. Sobre dos estudios de cohortes de más de 100.000 pacientes, que no habían sido sometidos a ninguna prueba diagnóstica previa, encontró un aumento constante en el riesgo de CCR en hombres y mujeres con antecedentes familiares de la enfermedad. El aumento en el riesgo, de aproximadamente 1,7 veces, fue prácticamente idéntico en las cohortes de dos estudios realizados de forma independiente, y el riesgo aumentó significativamente si había antecedentes de dos o más familiares afectados. La importancia de los antecedentes familiares fue mayor para las personas que tenían 44 años o menos. Como conclusión extrajeron que para la mayoría de las personas con antecedentes familiares de CCR, en particular los que tienen 60 años o más, el exceso de riesgo de CCR no es grande.

Hasta 12 estudios retrospectivos realizados anteriormente habían mostrado que un antecedente familiar de CCR se relacionaba un OR entre 1,8 y 8 veces mayor de padecer CCR en pacientes con historia familiar. Los factores que más se relacionaron fueron los pacientes jóvenes, aquellos cuyos familiares recibieron el diagnóstico a una edad temprana y los que tenían dos o más familiares afectos (7).

Los factores que explican esta agregación familiar no están del todo claro, pero se ha hipotetizado que podría estar relacionado con el componente genético familiar, factores ambientales comunes, epigenética, etc.

1.1.2.4. Patologías previas

Se han descrito varias patologías que predisponen al desarrollo de CRC a través de diferentes procesos etiopatogénicos.

Por un lado, los procesos fisiopatológicos implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal aumentan la incidencia de CCR (17).

Por otro lado, los cambios moleculares desencadenados por la inflamación crónica que caracteriza a enfermedades como el Crohn o la colitis ulcerosa parecen ser una contribución importante a los procesos que desencadenan y favorecen la carcinogénesis, ya que crean un microambiente adecuado para el inicio y progresión de la enfermedad. Este estado es común a la enfermedad de Crohn y al CCR, por lo que se asocia a un aumento del riesgo de desarrollo de neoplasias colorrectales (18).

Como ya se ha mencionado, la aparición de pólipos adenomatosos no cancerosos también predispone al desarrollo de nuevos pólipos, además de CRC (19).

1.1.2.5. Factores ambientales

Se considera que hasta un 70-80% de los CCR pueden deberse a factores ambientales (3). La amplia variación geográfica en las tasas de incidencia del CCR y los datos de estudios de migrantes sugieren que los factores de riesgo del estilo de vida, incluida la dieta, la actividad física, la obesidad y enfermedades como la diabetes, juegan un papel fundamental en la etiología de la enfermedad (20). Poblaciones que conviven en la misma comunidad pero que llevan estilos de vida diferentes presentan niveles diferentes de incidencia entre ellos. Otro argumento a favor de la importancia de los factores ambientales en el CCR es que los inmigrantes dejan de presentar el riesgo calculado para sus poblaciones de origen y adoptan la incidencia de la región en tan solo una generación (3).

Las diferencias étnicas y raciales en el CCR así como los estudios en inmigrantes sugieren que los factores ambientales juegan un rol mayor en la etiología de esta enfermedad. Por todo ello, una gran proporción de casos puede ser prevenida mediante el control de los factores ambientales como por la instauración de programas de detección secundaria (21).

1.1.2.6. Hábitos dietéticos y nutricionales

La proporción de CCR atribuido a factores dietéticos se ha estimado en alrededor del 50% (22). Se ha sugerido que aproximadamente el 66-77% del CCR se puede

prevenir mediante una combinación adecuada de dieta y actividad física (23). La evidencia procedente de estudios epidemiológicos muestra resultados consistentes de que el consumo de grasa animal y carne está directamente relacionado con el desarrollo de CCR, no encontrándose relación con el consumo de grasa vegetal. En un estudio sobre una muestra de 88.750 mujeres se vio que el riesgo de CCR era hasta 2,5 veces mayor entre las mujeres que comían carne todos los días respecto a las que comían carne menos de una vez al mes (3).

La dieta con alto contenido en fibra y un bajo contenido en grasa parece ser que tiene un efecto reductor sobre el riesgo relativo (RR) del CCR (24), explicándolo mediante un aumento de la masa fecal y reducción del tiempo de tránsito.

En un meta-análisis realizado por Huxley et al. Se observó que las personas en el nivel más alto de consumo de carne roja en comparación con aquellos en el nivel más bajo de ingesta de carne procesada tuvieron un 20% más de riesgo de desarrollar CCR (20).

Muchos estudios han encontrado el consumo de fibra proveniente de frutas y vegetales como un factor protector, no encontrándolo así en el caso de la fibra que proviene de cereales, lo que ha llevado a sugerir que la cantidad de fibra no es un factor protector en sí, sino un marcador de consumo de frutas y vegetales (3). Sin embargo, Huxley et al. no encontraron asociación entre el consumo de fruta y la incidencia de CCR (20).

1.1.2.7. Ejercicio físico, índice de masa corporal e ingesta calórica

Algunos estudios epidemiológicos muestran una asociación fuerte entre la actividad física, tanto ocupacional como recreacional, y un menor riesgo de CCR. Este efecto se ha visto incluso despejando posibles factores de confusión como la dieta o el índice de masa corporal (25). Arem et al. encontraron una relación inversa entre el ejercicio físico y la incidencia general de cáncer. Esta relación fue mayor en el caso del CCR, hígado, pulmón y linfoma no Hodgkin (26).

Otros datos, en cambio, no muestran relación entre la obesidad y el CRC aunque en estudios recientes si que han encontrado una relación entre la obesidad y el desarrollo de adenomas (lesión premaligna que antecede 8-10 años al desarrollo del CRC) (3).

Este mayor riesgo asociado con una elevada ingesta calórica no parece ser el resultado simplemente de comer en exceso, lo que puede reflejar diferencias en la eficiencia metabólica. Si se excluye la posibilidad de que la asociación con la ingesta energética sea un artefacto metodológico, implicaría que las personas que usan energía de manera más eficiente presentan un menor riesgo de CCR (3).

1.1.2.8. Terapia hormonal sustitutiva

El aumento de la evidencia apoya una asociación (originalmente inesperada) entre la terapia de reemplazo hormonal y un riesgo reducido de CCR (1,3). Sin embargo, no se sabe si esta asociación es causal o está asociada con algún factor de selección que dirija a las mujeres a usar la terapia de reemplazo hormonal.

1.1.2.9. Consumo de alcohol y Tabaco

Huxley et al. indicaron que, el riesgo de CCR en individuos que se categorizaron como "bebedores compulsivos" fue aproximadamente 60% mayor respecto de aquellos clasificados como no bebedores y, un 16% superior en personas fumadoras respecto a las no fumadoras, aunque estos resultados mostraron un alto grado de heterogeneidad (20).

1.2. METÁSTASIS HEPÁTICAS

El hígado es el órgano en el que con más frecuencia se desarrollan metástasis procedentes de tumores que drenan por vía portal, como es el caso de CCR (27,28). Aunque muchos son los artículos que hablan sobre su tratamiento, pocos son los que hablan de la epidemiología de esta patología. Los estudios poblacionales han demostrado que alrededor del 25-30% de los pacientes diagnosticados con CCR desarrollan MHCCR, tanto sincrónicas como metacrónicas, durante el curso de su enfermedad (29,30).

Un estudio de cohortes realizado entre los años 1976 al 2000 (29) encontró que un 14,5% de los pacientes con CCR presentaban metástasis en el momento del diagnóstico del tumor primario de CCR, metástasis sincrónicas, de ellas el 76,8% fueron MHCCR, mientras que el 23,2% se correspondieron con otras metástasis viscerales. Observaron también que la frecuencia fue superior en varones que en mujeres (15,9% vs. 12,8%) y que la proporción de CCR con metástasis hepáticas iba disminuyendo progresivamente a medida que aumentaba la edad.

Mantke et al. (34), estudiando la incidencia de las metástasis diferenciadas por su origen, entre cáncer de colón y cáncer de recto, observaron que ésta fue superior en el cáncer colon (18,3-19,7%) respecto al cáncer de recto (14,4-15,5%). A diferencia del estudio de Manfredi et al. (29), del total de metástasis detectadas, sólo el 66% se correspondieron con MHCCR, encontrando, también, una mayor incidencia en hombres respecto a mujeres. Además, concluyeron que con el aumento en la escala de estadiaje TMN, el riesgo de MHCCR aumenta ($p < 0,001$).

En el estudio realizado por Engstrand et al. con una muestra de 1026 pacientes, reflejó una incidencia del 26,5% de MHCCR, de las cuales un 16,2% correspondieron a metástasis sincrónicas y un 10,3% correspondieron a metástasis metacrónicas, desarrolladas en los 5 años siguientes al diagnóstico. En este estudio también se encontró una mayor incidencia de metástasis hepáticas en pacientes varones y en aquellos que presentaban cáncer de colon izquierdo (colon descendente, colon sigmoideo, recto). De los pacientes con metástasis sincrónicas tan solo un 36,1% presentaban metástasis únicamente en el hígado, frente al 22% de los pacientes con metástasis metacrónicas (32).

Por último Manfredi et al. observó que el 12,8% de los pacientes desarrollaron MHCCR metacrónicas en los 5 años siguientes al diagnóstico, pero no vio relación entre la localización del primario y la aparición de esas metástasis. Identificó 3 variables significativamente e independientemente asociadas con el riesgo de metástasis hepáticas metacrónicas: el estadio en el momento del diagnóstico fue el factor pronóstico más fuerte, el sexo y las características macroscópicas. Sin embargo, el tamaño del tumor no fue significativo (29).

1.2.1. Tratamiento quirúrgico de las MHCCR

Hoy en día, el *gold standard* en el manejo con intención curativa de las MHCCR es la resección hepática (RH) (33), pudiéndose realizar, también en pacientes seleccionados tratamientos ablativo a nivel local (radiofrecuencia, crioablación,...) (34).

Tras la RH de las MHCCR, la tasa de supervivencia (TS) a 5 años puede llegar a ser superior al 50%, respecto al 5% para pacientes sometidos a tratamiento paliativos (35). Sin embargo, a pesar de los avances oncológicos y quirúrgicos realizados, sólo alrededor del 25% de los pacientes afectados son susceptibles de RH (31) y, aproximadamente, el 85% de los pacientes con CCR en estadio IV, remitidos a centros especializados, tienen MHCCR inicialmente irresecables (36).

Tradicionalmente, la indicación de la RH se ha basado en las características de los implantes tumorales (tamaño, número, localización y/o extensión,...), patologías subyacentes o el compromiso vascular o del drenaje biliar del hígado tras la RH (32). Actualmente, su indicación, se centra más bien en el tejido hepático remanente tras la RH (THR), con resecabilidad definida como la capacidad de realizar una resección completa (R0), preservando al mismo tiempo un THR suficiente (32,37).

1.2.2. Micrometástasis

Se consideran micrometástasis a aquellas pequeñas cantidades de células cancerosas que se han diseminado desde el tumor primario a otras partes del cuerpo y son demasiado pequeñas en número y/o tamaño como para ser detectadas en una prueba diagnóstica (38). En pacientes con cáncer, las micrometástasis latentes (MML) a

menudo son asintomáticas y clínicamente no detectables, durante meses o años, hasta la recaída de la enfermedad (39,40). Los estudios clínicos de recidiva tumoral en pacientes con melanoma y cáncer de mama muestran que las células tumorales pueden sufrir un período de latencia seguido de un crecimiento rápido durante la recaída (40,41).

Afortunadamente, el proceso metastásico es ineficiente en el sentido de que muy pocas células tumorales liberadas en la circulación se convierten en metástasis (42)

Un estudio de Luzzi et al. con células de melanoma inyectadas en la porta reveló que más de un 80% de las células vertidas al torrente sanguíneo fueron capaces de sobrevivir y más de un tercio de las células extravasadas todavía estaban presentes en el tejido el día 13, como células cancerosas solitarias, en su mayoría en estado quiescente. Tan solo un 5% de esas células solitarias estaban en fase de proliferación o apoptosis (frente al 97% de células en un tumor primario), lo que demuestra la poca actividad de las células solitarias (43).

En este sentido, se asume desde hace mucho tiempo, pero aún no se ha demostrado, que las células tumorales en estado de latencia entran en una fase G0 de crecimiento celular (44), sin embargo, otras hipótesis indican que hay un control del tamaño del tumor por el sistema inmune. Holmgren et al. demostraron que los tumores primarios producen factores antiangiogénicos que suprimen activamente el crecimiento de metástasis a distancia. Una vez retirado el tumor primario mediante cirugía estas células podrían volver del estado quiescente por dos motivos: una disminución de los factores antiangiogénicos producidos por el tumor primario y un aumento de los factores angiogénicos generados a consecuencia de la intervención quirúrgica (39,40,43,45).

El estado de latencia de las micrometástasis se produce, potencialmente, a través del equilibrio entre proliferación y apoptosis, pudiendo estar regulado por una variedad de moléculas, incluidos factores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1 α)), factores inmunológicos (antígenos HLA clase I), factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteínas de la matriz (trombospondina), por oncogenes, genes supresores de metástasis y características fenotípicas (bajos niveles de Ki-67) (46,47).

Curiosamente, la RH causa alteraciones importantes en los factores de crecimiento y las citocinas, cambiando el entorno de las micrometástasis latentes y probablemente conduciendo a su activación. Al mismo tiempo, la ruptura de la matriz tumoral en el propio acto quirúrgico para la extirpación de las metástasis y el proceso regenerativo que sigue, pueden promover el desprendimiento y la migración de las células tumorales dentro del THR o su extravasación a la circulación sistémica, lo que aumenta la recurrencia tumoral intra o extrahepática (48) (Figura 2).

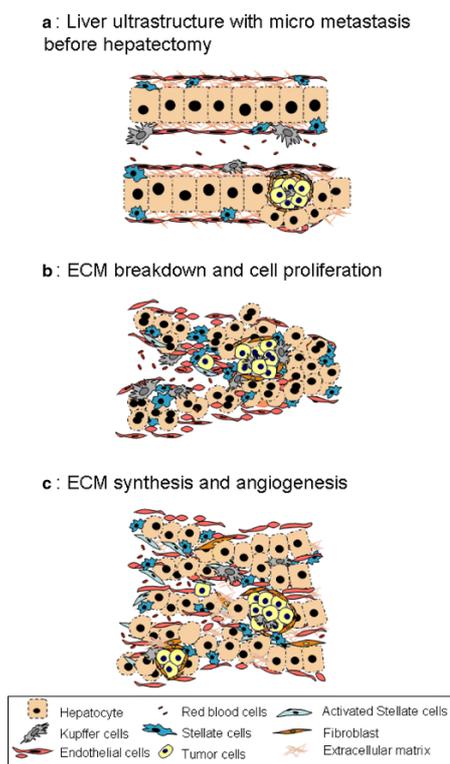


Figura 2. Cambios estructurales y moleculares durante la regeneración hepática y la recurrencia de las micrometástasis residuales. Tomado de Christophi et al., 2008.

En el caso de las MHCCR, las micrometástasis observadas en restos hepáticos tras la RH causan tasas elevadas de recidiva tumoral (49). Como las técnicas histológicas muestran una sensibilidad limitada en la detección de las micrometástasis, los métodos genéticos de detección están actualmente en fase de prueba en modelos animales, tratando de revelar de forma temprana y precisa la existencia de lesiones micrometastásicas (50).

1.3. REGENERACIÓN HEPÁTICA

La regeneración hepática es la respuesta fundamental del hígado frente al daño tisular (51). El hígado recupera su volumen original tras la regeneración, incluso si se reseca el 70% de su masa original, con el requisito previo de que el THR sea funcional y esté libre de enfermedad (52).

Las células responsables de la regeneración hepática y la reparación de tejidos son hepatocitos maduros y células epiteliales de los conductos biliares, aunque otras partes del parénquima hepático pueden contener y activar las células madre (53). Aunque los hepatocitos adultos son de larga vida y normalmente no se someten a la división celular, mantienen la capacidad de proliferar en respuesta a una lesión tóxica e infección (54).

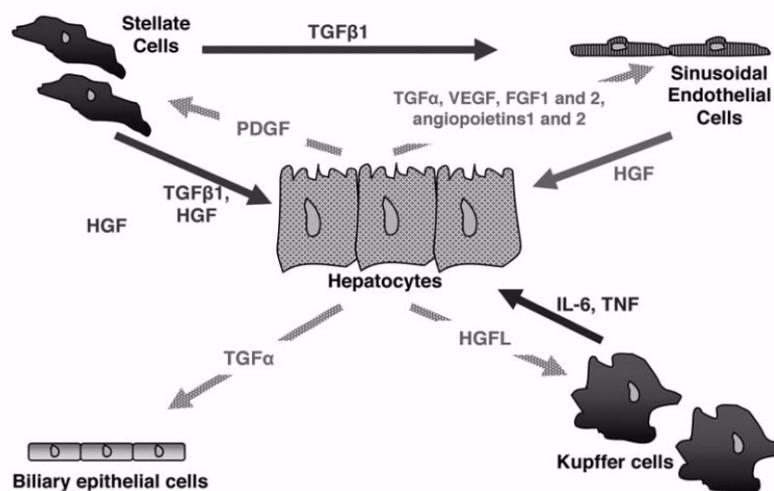


Figura 3. Interacciones celulares durante el proceso de regeneración hepática.

La secuencia de eventos que desencadenan la regeneración hepática después de la pérdida aguda de la masa hepática ha sido objeto de mucha investigación durante los últimos 20 años (55). En vista del hecho de que no se ha observado ningún modelo de ratón *knockout* que sea absolutamente letal tras una hepatectomía parcial del 70%, la teoría de la redundancia y la interrelación entre múltiples factores regenerativos es altamente compatible (30), por lo que, en general hay acuerdo en que un solo agente no puede conducir, por sí solo, a la regeneración hepática (48) (Figura 3).

1.3.1. Fases de la regeneración hepática

El proceso de regeneración hepática es muy complejo, estando constituido por una serie de etapas consecutivas (Figura 4): iniciación o *priming*, proliferación y terminación (51).

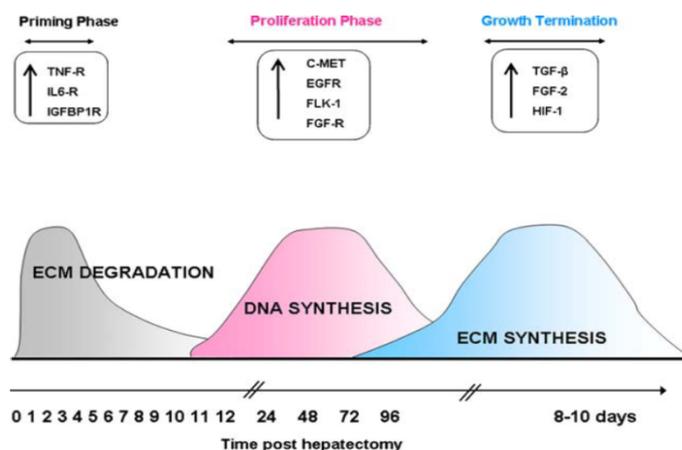


Figura 4. Fases de la regeneración hepática tras la resección hepática. Tomado de Christophi et al., 2008.

1.3.1.1. Iniciación o priming

Los hepatocitos en el hígado adulto normal se encuentran en la fase G0 del ciclo celular (55).

En esta fase, los hepatocitos, gracias a la cooperación de diferentes factores, superan los puntos de control del ciclo celular y pasan de la fase G0 (en estado de reposo) a la fase S (fase del ciclo celular donde se produce la síntesis de ADN) (56).

El *priming* ocurre en las 4 horas siguientes a la agresión tisular e implica la activación de diversos genes, asociados con la síntesis de factores de transcripción, respuesta inflamatoria, modificaciones de la matriz extracelular (MEC) y del citoesqueleto y regulación de los ciclos celulares (51). El objetivo de esta fase es preparar a los hepatocitos para responder a los factores de crecimiento presentes durante la etapa proliferativa.

Las vías de señalización de las citoquinas del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) son las principales vías activadas por citocinas y su duración de señalización está muy estrechamente controlada. Los hepatocitos cebados a través

de estas vías responden a factores de crecimiento y entrar en la segunda etapa, la etapa proliferativa (51).

1.3.1.2. Fase de proliferación

Tras el proceso de *priming*, los hepatocitos están ya preparados para responder a los factores de crecimiento. Las señales asociadas con la iniciación y el control de los eventos proliferativos después de una RH parcial se pueden separar en dos grupos: mitógenos completos y mitógenos auxiliares (48).

Los mitógenos completos son aquellos capaces de inducir mitosis en cultivos de hepatocitos en medios definidos (sin suero). Además, causan agrandamiento hepático y síntesis de ADN de hepatocitos cuando se inyectan en dosis suficientes en animales. Actualmente, hay dos grupos de señales que entran en esta categoría: 1) factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-Met y 2) ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) (factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), Heparin Binding-EGF (HB-EGF), Amphiregulin) (57).

Los mitógenos auxiliares por el contrario no tienen actividad mitógena en los hepatocitos en cultivos *in vitro*, ni tampoco causan síntesis de ADN en los hepatocitos ni agrandamiento hepático, cuando se administran *in vivo*. La lista de estas sustancias es relativamente larga e incluye, entre otros, norepinefrina, receptor adrenérgico α -1, factor de necrosis tumoral (TNF) y receptor factor de necrosis tumoral 1 (TNFr1), interleucina 6 (IL-6) Notch y Jagged (Jagged recombinante causa síntesis de ADN en cultivos de hepatocitos), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y receptores I y II, ácidos biliares, serotonina, proteínas del complemento, leptina, insulina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 1 y FGF2 (58).

Recientemente se ha demostrado que cambios en la actividad o la cantidad del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y su receptor (uPA_r), y en el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1), tienen un posible papel en la invasión metastásica de los tejidos por células tumorales (59). Pero también está implicado en la regeneración hepática, involucrado procesos de remodelación de la MEC para permitir la posterior división celular, la liberación de la forma de cadena

única de HGF (y posiblemente otros mitógenos) de la MEC y la conversión a la forma activa bicatenaria y la posible activación de una vía de señalización implicada en la mitosis (55).

1.3.1.3. Fase de terminación

Poco se sabe sobre esta fase aunque numerosos estudios han mostrado que al final de la regeneración cuando el hígado hepatectomizado alcanza el tamaño original pre-hepatectomía, con alta precisión, este proceso se detiene (60).

El fenómeno está bien documentado, pero no está claro si existen "moléculas sensoras" específicas que disparan o suprimen las señales relacionadas con el crecimiento para que el tamaño del hígado se mantenga adecuadamente (48).

Algunos estudios apuntan que los factores inhibidores de la proliferación, como la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que incluye TGF- β 1, β 2 y β 3, activinas e inhibinas, entre otros, están implicados en la etapa de terminación de la regeneración hepática (51).

Además de las etapas de la regeneración hepática mencionadas, cabe destacar que durante este proceso se produce una desestructuración de la MEC (61). Mediante la acción de las metaloproteinasas (MPP) secretadas por pericitos en respuesta a la estimulación con HGF (62).

La descomposición y reconstrucción de la MEC durante la regeneración hepática puede ser una fuente importante de metástasis tumoral, tanto intra como extrahepática. Las células tumorales en las micrometástasis pueden separarse y llegar a otras zonas hepáticas o a la circulación sanguínea y linfática (57).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La cirugía de RH en el tratamiento de las MHCCR desencadena una cascada de acontecimientos a nivel molecular y/o celular que:

- Promueve la reparación de la herida quirúrgica, facilitando su cicatrización, a la vez que favorece la regeneración hepática, activando a los hepatocitos que permitan un crecimiento del tejido hepático remanente.
- Reactiva las micrometástasis latentes, por el aumento en los niveles de factores de crecimiento pro-angiogénicos, factores inmunológicos, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, activación de oncogenes, desactivación de genes supresores de tumores.

Es por ello, que para comprobar estas hipótesis, se planteó un trabajo combinado de búsqueda bibliográfica, de los factores responsables de la reactivación de las micrometástasis durmientes, y experimental *in vivo*, con el que simular una cirugía de RH del 40% con presencia de micrometástasis circulantes en el árbol vascular, para evaluar el porcentaje de superficie hepática ocupada por metástasis.

3.2. OBJETIVOS

Por tanto, basándonos en lo anteriormente comentado, los objetivos de este trabajo son:

- Realizar una búsqueda bibliográfica para identificar las moléculas y/o rutas de señalización celular comunes a ambos procesos, tanto la regeneración hepática como el desarrollo de metástasis.
- Comprobar el efecto de la RH parcial del 40% en el grado de desarrollo de MHCCR en un modelo experimental murino.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se planteó de una doble perspectiva: 1) una revisión bibliográfica para conocer las rutas y moléculas comunes al proceso natural de regeneración hepática y a la activación y desarrollo de las micrometástasis latentes no detectables y 2) un trabajo experimental que demostrase que, efectivamente, la regeneración hepática tras una hepatectomía curativa del 40% incrementaba el grado de desarrollo de MHCCR.

4.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la búsqueda bibliográfica se empleó la base de datos Pubmed.

El objetivo de esta búsqueda bibliográfica fue encontrar artículos de investigación/revisión que hablen sobre los factores que participan en la regeneración hepática y que al mismo tiempo influyen en el crecimiento de metástasis, en nuestro caso de MHCCR. Por lo que para realizar la búsqueda bibliográfica se utilizaron los siguientes criterios.

4.1.1. Criterios de búsqueda

En primer lugar se consultó bibliografía básica aportada por el director del presente Trabajo en relación a las metástasis hepáticas y su tratamiento, así como sobre los procedimientos quirúrgicos que fueron necesarios para la realización de la parte experimental del trabajo.

En segundo lugar se establecieron los términos MeSH de búsqueda a emplear: “Mesh ‘‘neoplasm metastasis’’, ‘‘Growth’’, ‘‘Hepatectomy’’, ‘‘Colorectal neoplasm’’ y se aplicó el subheading ‘‘growth and development’’. La búsqueda se realizó en la base de datos mencionada, sin restricciones de lengua, utilizando diferentes combinaciones de los términos que se acaban de indicar y diferentes booleanos.

Con esta búsqueda se obtuvieron 23 artículos que fueron incluidos en su totalidad en un primer momento.

4.1.2. Criterios de inclusión y exclusión

De la búsqueda inicial, que dio lugar a un total de 23 artículos, se aplicaron los criterios de exclusión que se detallan:

1. Artículos que traten de masas hepáticas correspondientes a carcinomas hepatocelulares o hepatoblastomas.
2. Artículos que traten del crecimiento de metástasis tras un tratamiento diferente a la hepatectomía.
3. Artículos sobre técnicas radiológicas para detectar metástasis.
4. Artículos que hablen sobre la prevención de aparición de metástasis sin hepatectomía.

El algoritmo de búsqueda generado fue el siguiente:

```
("neoplasm metastasis"[MeSH Terms] OR ("neoplasm"[All Fields] AND "metastasis"[All Fields]) OR "neoplasm metastasis"[All Fields] OR "metastases"[All Fields]) AND ("growth and development"[Subheading] OR ("growth"[All Fields] AND "development"[All Fields]) OR "growth and development"[All Fields] OR "growth"[All Fields] OR "growth"[MeSH Terms]) AND following[All Fields] AND partial[All Fields] AND ("hepatectomy"[MeSH Terms] OR "hepatectomy"[All Fields])) AND "colorectal neoplasms"[MeSH Terms]
```

Tras la búsqueda mencionada se obtuvieron 23 artículos. Sobre estos artículos se aplicaron los criterios de exclusión ya especificados y se descartaron 13 artículos. La bibliografía de los artículos seleccionados también fue examinada a modo de material complementario para identificar literatura adicional.

4.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

Todos los procedimientos realizados para este trabajo han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), código M20/2015/054 HERRERO DE LA PARTE. Los procedimientos se han realizado siguiendo la normativa vigente en experimentación animal.

4.2.1. Animales de experimentación

Como modelo *in vivo* de experimentación se emplearon 18 ratas albinas macho de la cepa WAG/RijHSd, de 3 meses de edad y 270-300 gramos de peso.

Durante todo el tiempo que duró el desarrollo del proyecto, los animales estuvieron estabulados conforme a la legislación vigente, en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con comida y agua *ad libitum*.

4.2.2. Cultivos celulares

Las células empleadas en este trabajo, correspondientes a una línea de carcinoma de colon de rata (CC531), fueron adquiridas en origen a la empresa *Cell Line Services* (Alemania) en pase p22.

Los viales fueron extendidos hasta pase p24 y conservados en viales de 1 ml con una concentración de 10^6 células/ml en nitrógeno líquido hasta el momento en el que se fueran a emplear para los experimentos.

Para la obtención de las células necesarias para la inoculación, que se explicará en el más adelante, se descongeló un vial atemperándolo a 37° C, durante aproximadamente 2 minutos. Seguidamente, el contenido del vial se sembró en un frasco de cultivo plano adherente T25 junto con 2 ml de medio de cultivo RPMI-1620 y un 1 ml de suero bovino fetal (SBF), y se dejó en crecimiento por un periodo de 4 a 6 horas en un incubador a 37° C 5% CO₂ y atmosfera húmeda. Trascorrido este tiempo, se reemplazó este medio de cultivo por medio de cultivo fresco suplementado con 10% SBF, dejándose las células en crecimiento durante las siguientes 24 horas, en las condiciones antes descritas, procediéndose de nuevo a cambiar el medio de cultivo por medio fresco. Este procedimiento se repitió cada 48

horas hasta que el cultivo llegó a un estado de semiconfluencia. Una vez alcanzó dicho estado, se eliminó el medio de cultivo y se añadió 2-3 ml de tripsina-EDTA (Tris-EDTA) devolviéndose el frasco de cultivo al incubador durante 3-5 minutos, hasta que se comprobó que las células estaban despegadas del fondo del frasco de cultivo. La suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico de 15 ml que contenía 1 ml de SBF y se lavó el frasco de cultivo con RPMI para arrastrar las células que pudieran haberse quedado adheridas al frasco. Toda la suspensión celular obtenida se centrifugó a 1500 rpm/min durante 5 minutos a 7° C. Transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 5 ml de RPMI. La suspensión celular se sembró en un frasco de fondo plano y adherente T75 en un volumen total de 15 ml de suero RPMI suplementado con un 10% de SBF. El medio de cultivo se cambió cada 48 h por medio fresco suplementado con 10% de SBF. Una vez que el cultivo alcanzó el estado de confluencia, las células fueron despegadas utilizando Tris-EDTA y la suspensión celular obtenida se centrifugó a 1500 rpm/min durante 5 minutos a 7° C.

El pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de medio Hank's y, empleando una cámara de Neubauer o hemocitómetro, se calculó la concentración celular de dicha suspensión. Una vez conocida se ajustó el volumen de la suspensión empleando más solución de Hank's hasta conseguir una concentración celular de 500.000 cel/ml. La suspensión celular se mantuvo en hielo hasta el momento de su inoculación en los animales.

4.2.3. Inoculación celular

Para la inducción vía esplénica de MHCCR de asiento hepático, los animales, bajo anestesia inhalatoria con isoflurano al 1,5%, fueron colocados en posición decúbito supino sobre una manta calefactora, se rasuró el pelo de la zona quirúrgica, se aplicó una solución antiséptica de Betadine® y se realizó una laparotomía subxifoidea de 5 cm. Previo a la inoculación, en ambos grupos, se localizó el pedículo vascular del LLI y se clampó con un clamp de Yasargil para aneurismas craneales, de esta forma, al realizar la RH en el grupo RH, no se eliminó el pool de células tumorales inoculadas que podrían implantarse en dicho lóbulo. En el grupo control, se localizó el bazo y se inoculó 0,5 ml de la suspensión celular de 5×10^5 células/ml en su tercio

distal. Para evitar la hemorragia del sitio de punción, se realiza una compresión circunferencial con una ligadura. Los órganos eviscerados fueron devueltos al interior de la cavidad abdominal y tras 5 minutos de espera, se volvió a extraer el bazo para realizar la esplenectomía, ligándose previamente las arterias y venas esplácnicas.

En el grupo RH, se realizó el mismo procedimiento para la inoculación celular antes descrito, pero después de la esplenectomía se procedió a realizar una RH del 40%, extrayendo para ello la totalidad del lóbulo lateral izquierdo (LLI).

Una vez finalizados los procedimientos de inoculación y esplenectomía y RH en el grupo correspondiente, las vísceras fueron reintroducidas en la cavidad abdominal y se procedió a la sutura de la herida en dos planos mediante puntos simples sueltos, empleando sutura sintética absorbible de ácido poliglicólico (Coated VICRYL®, ref.: J310H Ethicon Inc., EEUU) de 4/0 para el plano muscular y seda trenzada de 3/0 (ref.: 55346, Lorca-Marín S.A., España) para la piel. Una vez suturada la herida quirúrgica, subcutáneamente se administró Meloxicam (2mg/kg) y se dejó al animal hasta su total recuperación bajo una fuente de calor. Tras la recuperación, cada 12 horas, durante un máximo de 3 días, los animales recibieron Buprenorfina s.c. (0,05 mg/kg).

Después de dejar un periodo de 25 días para el desarrollo tumoral, se realizó, bajo anestesia inhalatoria, una laparotomía total para la extracción del hígado metastásico y se procedió a la eutanasia de los animales por exanguinación, seccionando la arteria aorta abdominal. Tras la extracción el hígado se fijó mediante inmersión con formaldehído al 10%, durante al menos 24h antes de su procesamiento.

4.2.4. Procesamiento de la muestra

Para proceder al corte de los lóbulos hepáticos en secciones de aproximadamente 1 mm de grosor, en primer lugar, se separaron e identificaron cada uno de los cuatro lóbulos en los que se divide la masa hepática total de las ratas: lóbulo caudado (LC), lóbulo paramediano (LPM), lóbulo lateral derecho (LLD) y el LLI.

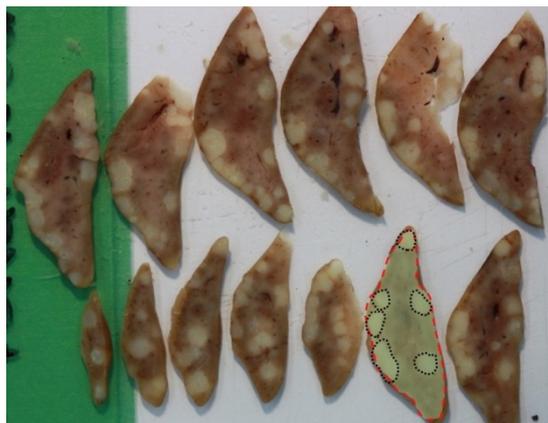


Figura 5. Imagen representativa de uno de los lóbulos hepáticos seccionados para realizar las medidas de área total hepática (sombreado en verde y delimitado por la línea discontinua roja) y área colonizada por metástasis (sombreado en verde y delimitado por línea discontinua negra).

Una vez seccionados los lóbulos hepáticos se tomaron fotografías de cada uno de los lóbulos por separado y se midió el área total de la masa hepática y el área correspondiente a las metástasis mediante el programa ImageJ versión 1.8.0_112 (NIH, EEUU), y así se calculó el área tumoral relativa (ATR%) (área ocupada por metástasis/área hepática total x 100) (Figura 5).

Posteriormente se procedió al análisis estadístico de los resultados mediante el programa PRISM (GraphPad Software, EEUU).

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La realización de RH en el tratamiento de MHCCR desencadena el proceso de regeneración hepática, donde numerosas estirpes celulares y moléculas median en múltiples vías de señalización. Al mismo tiempo, varios estudios clínicos y experimentales han sugerido que las moléculas específicas que regulan la regeneración hepática también pueden promover el crecimiento de micrometástasis latentes residuales en el postoperatorio, lo que lleva a la progresión de la enfermedad (63,64). Sin embargo, la presencia de micrometástasis y su asociación con la recidiva tumoral, el momento del desarrollo de nuevas lesiones metastásicas y los factores regenerativos responsables que apoyan la progresión neoplásica son fenómenos todavía poco comprendidos (65).

Se considera que ciertas moléculas que median la regeneración hepática desempeñan un papel significativo en la recurrencia del tumor y han sido estudiadas por múltiples grupos de investigación (57). HGF, EGF, VEGF, TGF- β 1 y MMP atraen gran interés entre otros numerosos agentes que también intervienen al proceso regenerativo (53) (Tabla 1).

Tabla 1. Moléculas implicadas en los procesos de regeneración hepática y en el desarrollo de metástasis y su tiempo de aparición tras una RH parcial.

Activated biological factor or pathway after partial hepatectomy	Time after partial hepatectomy
Urokinase	5 min
Notch intracellular domain (NICD) translocation to cellular nucleus	5 min
Beta-catenin translocation to cellular nucleus	5-10 min to 6 hours
Hepatocyte growth factor receptor (HGFR)	30-60 min
Epithelial growth factor receptor (EGFR)	30-60 min
Increase of plasma concentration of: Hepatocyte growth factor (HGF), norepinephrine, interleukin 6 (IL-6), tumour necrosis factor alpha (TNF α), transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) and hyaluronic acid	1-2 hours
Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)	30-60 min
Hepatocyte gene expression reprogramming	30 min
Metalloproteinase 9 (MMP-9)	30 min

Cytokines, growth factors, paracrine and neuroendocrine factors are activated after partial hepatectomy, mainly within the first 60 minutes (12, 13, 45, 52).

Los datos experimentales de RH parciales realizadas en ratones sugieren que las citocinas proinflamatorias están implicadas en la recurrencia metastásica. Se ha descubierto que el aumento de la expresión del TNF α , interleuquina 1 beta (IL-1 β) e IL-6 se correlaciona con un aumento de la proliferación de células malignas (66).

Además, la realización de RH de un volumen elevado del parénquima hepático parece influir significativamente en el crecimiento neoplásico y la extensión de las lesiones extrahepáticas, predominantemente en los pulmones, en comparación con RH de menor volumen hepático (64).

La recurrencia de metástasis hepáticas, así como la progresión sistémica del tumor, se producen principalmente en la fase tardía de la regeneración hepática, en lugar de en la fase temprana (51). Esto puede indicar que factores que toman parte en las diferentes fases de la regeneración hepática tienen mayor peso en la progresión de la enfermedad.

Como más adelante veremos, hoy en día existen anticuerpos monoclonales e inhibidores que buscan evitar la progresión de la enfermedad y que tienen gran importancia en los estadios avanzados.

5.1.1. Factor de crecimiento hepatocitario

El HGF es considerado uno de los principales agentes implicados en la regeneración hepática (67), siendo el mitógeno hepático más potente hasta ahora descubierto (68), además de ser considerado un importante factor morfogénico y angiogénico sobre las células epiteliales normales y neoplásicas (69).

El HGF, almacenado en la matriz hepática en grandes cantidades pero también producido en otros órganos (entre los que destaca el pulmón), se libera rápidamente 1-2 horas después de una RH parcial, aumentando entre 6 y 8 veces los niveles intrahepáticos, mientras que sus niveles plasmáticos aumentan de 10 a 20 veces (51). Es producido y secretado por las células estrelladas, las células endoteliales sinusoidales y las células de Kupffer, actuando de forma paracrina (70).

Actúa a través de un receptor de tirosina quinasa que está codificado por el protooncogén c-Met y ejerce efectos mitogénicos sobre los hepatocitos y otras células, así como los efectos morfogenéticos y angiogénicos en las células normales y neoplásicas. Además de los efectos proliferativos sobre los hepatocitos sanos, el HGF estimula la infiltración y la migración tumoral a través de una actividad aumentada de las MMP. La actividad de la proteinasa bajo la influencia de HGF puede causar brechas en la membrana basal y facilitar la metástasis (48,71,72).

En estudios *in vitro*, Tamatani et al. observaron que la adición de HGF exógeno aceleró la migración e infiltración tumoral y aumentó la actividad de MMP, lo que evidencia su papel importante en la invasión y progresión tumoral, estimulando la motilidad celular y la secreción de proteinasas, que lisan la membrana basal de las metástasis (73–75). Además, el HGF, es ocasionalmente secretado por ciertas estirpes tumorales, estimulando el crecimiento tumoral de manera autocrina (75).

Esta molécula demostró también tener interés clínico puesto que, análisis realizados sobre muestras humanas, revelaron que una alta expresión del receptor del HGF (HGFr) se asocia con el estadio D de la clasificación de Duke y con un alto potencial metastásico, lo que sugiere su implicación en los procesos de desarrollo de metástasis (63).

Al mismo tiempo, como ya se ha mencionado anteriormente, el HGF aumenta la migración e infiltración tumoral (73) por lo que podría estar estimulando la aparición de metástasis.

5.1.2. Factor de crecimiento transformante β

El TGF- β se produce principalmente por las células estrelladas, aunque puede encontrarse en la mayoría de los tejidos (76) En el hígado sano, el TGF- β tiene dos funciones: inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis (77). Tras producirse un daño hepático, se incrementa su producción (78), actuando, principalmente, al final del proceso de regeneración hepática secuestrando a las células que se encuentran en fase G1, inhibiendo su crecimiento (79).

En cuanto a su función asociada a las células tumorales, el TGF- β 1 promueve la formación de estroma tumoral, angiogénesis e inmunosupresión. En las metástasis de CCR contribuye, además, facilitando la expresión de moléculas de adhesión, como las integrinas (80). Durante el proceso metastásico, el TGF- β , promueve también la acumulación de glicoproteínas MEC y proteínas de adhesión (81). A nivel clínico, los niveles séricos de TGF- β se correlacionan con el desarrollo de metástasis hepáticas después de una resección hepática potencialmente curativa (82).

Teramoto et al. demostraron la pérdida del receptor de TGF- β (TGF- β r) en células preneoplásicas y malignas de ratas, ratones y humanos. Este hecho evidencia que la

pérdida de la señalización antiproliferativa de TGF- β da como resultado la carcinogénesis (83).

En ensayos clínicos, Tsushima et al. midieron los niveles plasmáticos de este factor en pacientes con CCR, y observaron que existía correlación entre los niveles de TGF- β 1 y la extensión de la enfermedad, por lo que sugirieron su eficacia como predictor de metástasis hepáticas (evaluado dos semanas después de una RH parcial con intención curativa) (84).

Por todas estas evidencias, la inhibición de TGF- β 1 parece ser una buena diana terapéutica contra el cáncer y ya son varios los compuestos que están siendo estudiados en estudios preclínicos y clínicos (85). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la función de este factor de crecimiento es dual y cualquier inhibición farmacéutica de TGF- β 1 puede afectar tanto a su actividad inhibidora del crecimiento y como pro-apoptótica (86).

5.1.3. Factor de crecimiento endotelial vascular

El VEGF se considera el regulador inicial de la angiogénesis y la permeabilidad vascular (51). Los factores de crecimiento angiogénicos, que promueven la formación de neovasos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, aumentan durante la regeneración hepática (59).

En los procesos de regeneración hepática, se ve incrementado aproximadamente dos horas después de la RH y permanece incrementado a lo largo del proceso regenerativo (58). Su acción mitógena la realiza principalmente sobre las células endoteliales sinusoidales (87).

Altos niveles de VEGF, producidos por los propios tumores, se asocian con un aumento de la vascularización del tumor, metástasis, quimiorresistencia y mal pronóstico (88). VEGF también induce la síntesis de un factor derivado del estroma (SDF-1) que recluta células circulantes desde la periferia hasta el sitio del tumor donde se diferencian en fibroblastos asociados al cáncer (CAF). Estos producen factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) y muchos otros factores asociados con la remodelación de la MEC y la angiogénesis (89).

5.1.4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

El EGFr, comprende el segundo sistema principal de señalización en la regeneración hepática, después del HGF/c-Met (90). La unión del ligando al EGFr da como resultado la activación de su actividad tirosina quinasa (TK) que inicia la transducción de señal mediada por receptor, la mitogénesis celular y la transformación celular. Los ligandos de EGFr incluyen EGF, TGF- α , anfiregulina, HB-EGF, epirregulina y celulina. La unión de estos ligandos al receptor produce una modulación funcional diferente para cada uno de ellos (90).

La sobreexpresión de EGFr se correlaciona con la recidiva tumoral temprana y la aparición de metástasis extrahepáticas (91). La señalización de EGFr también induce la regulación positiva de VEGF y la inducción de angiogénesis (57).

Por esta correlación con la recidiva de la enfermedad y aparición de metástasis, así como su implicación en la regulación de la angiogénesis, se han desarrollado muchas terapias dirigidas contra el EGFr. Por ejemplo, la terapia con cetuximab, gefitinib o panitumumab (todos ellos inhibidores de EGFr) en modelos de CCR, produce una disminución de la expresión de VEGF, b-FGF y TGF- α y una reducción en el recuento de microvasos (92). Cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 que se usa actualmente contra las metástasis de CCR en monoterapia o en combinación con otros agentes. El panitumumab es un anticuerpo monoclonal IgG2 aprobado como agente único para el CCR metastásico(51). El resultado prometedor de estas terapias ha provocado que se estén desarrollando nuevos fármacos dirigidos en esta dirección (92).

El TGF- α , otro ligando de EGFr, también se regula positivamente en la regeneración hepática y se asocia con mal pronóstico de supervivencia y desarrollo de metástasis cuando aparece sobreexpresado en el tejido tumoral (57).

5.1.5. Factor de crecimiento de insulina I

Aunque no se ha demostrado que el factor de crecimiento de insulina I (IGF-I) se vea alterado tras una RH parcial, y tampoco se le atribuye ninguna función en el proceso de regeneración, el IGF juegan un papel crítico en la regulación del crecimiento y la muerte celular a través de la interacción con el principal receptor de IGF (IGFr) que

se sobreexpresa en ciertos cánceres (64). Existe evidencia que demuestra que el IGF-I y su receptor de TK desempeñan un papel importante en el desarrollo y la progresión de una variedad de cánceres humanos, incluido CCR (93).

Además, también se sabe que aquellos tumores que expresan altos niveles de IGFr, colonizan el hígado más fácilmente que los tumores que presentan bajos niveles de IGFr (94). Esta puede ser la razón por la cual la mayoría de las metástasis de CCR se encuentran en el hígado.

Warren et al. demostraron que IGF-I induce la expresión de VEGF en células de CCR *in vitro* (95). De forma similar al HGF/c-Met, se sabe que la señalización IGF-I/IGFr induce la migración, invasión y angiogénesis de células tumorales, estimulando la expresión de VEGF de las células endoteliales y promoviendo su migración (96).

Todo esto evidencia que el IGF-I es un regulador de la cascada angiogénica. Pero, incluso si no hay aumento en el IGF-I durante la regeneración hepática, otros muchos factores promotores de tumores influyen en la señalización IGF-I/IGFr, lo que sugiere que IGF-I tiene un papel clave en la aceleración del crecimiento tumoral y actividad metastásica asociada con hepatectomía (57).

5.1.6. Factor de necrosis tumoral

Los niveles plasmáticos de TNF aumentan después de una RH parcial y contribuyen en el proceso regenerativo hepático tempranamente alterando la ruta de señalización de las integrinas, induciendo la expresión de metaloproteinasa 9 (MMP-9) por los hepatocitos y activando el TGF- α (97).

La activación de MMP-9, que ocurre en los primeros 30 minutos tras la RH parcial, causa la remodelación de la MEC, afecta a la señalización vía integrinas y libera factores de crecimiento y péptidos que promueven el proceso regenerativo (98).

Los datos experimentales de hepatectomías parciales realizadas en ratones sugieren que las citocinas proinflamatorias están implicadas en la recurrencia metastásica. Se ha descubierto que la expresión incrementada de TNF- α , interleuquina 1 beta (IL-1 β) e IL-6 se correlaciona con un aumento de la proliferación de células malignas (48).

5.1.7. Metaloproteinasas de la matriz

El papel de las MMP es mantener la homeostasis en el entorno extracelular. En la regeneración hepática, desempeñan un papel central en el inicio de la activación o en la activación del factor de crecimiento, y en la descomposición y remodelación de la MEC (61). La estructura colágena de la MEC y el equilibrio dinámico entre la fibrogénesis y la fibrólisis son muy importantes para el crecimiento tumoral (99). Las MMP median estas rutas moleculares y están implicadas en la migración de células cancerígenas. Forman una familia de 24 endopeptidasas de zinc, que no solo degradan la MEC, sino también proteínas que no son de la matriz. La MMP-9 aumenta durante los primeros 30 minutos después de RH, mientras que MMP-2 después de 12 horas y desempeña un papel crucial en la regeneración hepática (99).

Además de la degradación de MEC, las MMP promueven la progresión tumoral modulando la generación y activación de moléculas clave en diversas vías de señalización, incluidos los factores de crecimiento y las quimiocinas (100).

Múltiples estudios implican ambas moléculas en la progresión del CCR y las MHCCR (101). El desarrollo de inhibidores de MMP continúa atrayendo un interés sustancial de investigación: se han producido y probado muchas moléculas, pero solo una ha sido aprobada para aplicaciones clínicas dentales (48).

También han sido implicadas en las alteraciones de la membrana basal que conducen a la metástasis tumoral (102). La sobreexpresión de MMP concretas se ha correlacionado con la progresión tumoral, y los modelos transgénicos de ratón que sobreexpresan MMP respaldan este hallazgo (103).

5.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tras haber realizado los experimentos detallados en la parte correspondiente del apartado de Material y Métodos, a continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de los grupos experimentales sometidos o no a hepatectomía posterior a la inducción tumoral.

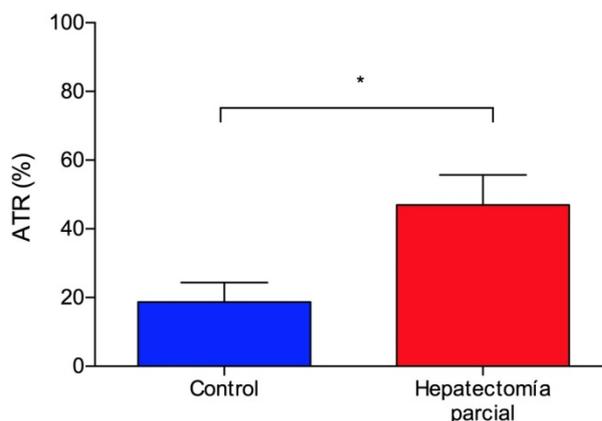


Figura 6. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie total hepática invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).

En la Figura 6 se observa el ATR (%) del conjunto de lóbulos hepáticos. En el grupo control la superficie total ocupada por metástasis fue de un $17 \pm 19\%$ con respecto a la masa hepática total. Sin embargo, en el grupo sometido a hepatectomía hubo un incremento de la superficie ocupada por metástasis de, aproximadamente, 2,5 veces ($47 \pm 26\%$), siendo la diferencia estadística significativa ($p < 0,05$).

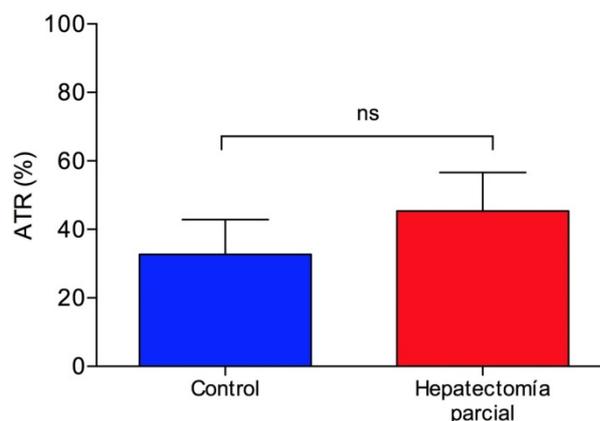


Figura 7. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie del LLD invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).

En la Figura 7 se pueden observar los resultados correspondientes al LLD. En el grupo control se observó una superficie ocupada por metástasis correspondiente al $33 \pm 29\%$ mientras que en el grupo en el que se realizó hepatectomía, la superficie ocupada fue del $45 \pm 34\%$. Pese a tener 1,36 veces más de superficie ocupada por metástasis no se alcanzó una significación estadística entre el área cuantificada en cada uno de los grupos.

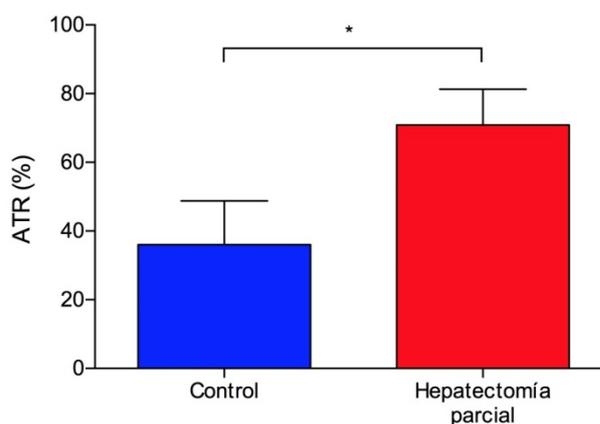


Figura 8. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie del LC invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo)

Respecto a los resultados del LC, Figura 8, en el grupo control se evidenció una superficie metastásica correspondiente al $36 \pm 36\%$, en cambio, en el grupo con RH

parcial del 40%, se observó un área correspondiente al $71 \pm 31\%$, siendo, las diferencias entre ambos grupos, estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

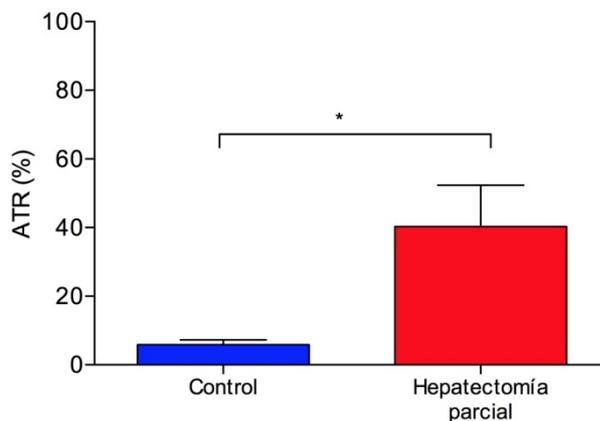


Figura 9. Diagrama de barras con el porcentaje medio de la superficie del LPM invadida por metástasis del grupo control (azul) y el grupo experimental sometido a hepatectomía (rojo).

En el LPM, Figura 9, fue donde mayores diferencias se encontraron en cuanto al ATR (%) entre el grupo control y el grupo hepatectomizado. El ATR (%) en este último fue 7 veces superior respecto al grupo control ($40 \pm 30\%$ vs. $5.9 \pm 3.2\%$) ($p < 0,05$).

6. DISCUSIÓN

6.1. MODELO DE INDUCCIÓN DE METÁSTASIS HEPÁTICAS

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de una RH del 40% en el grado de desarrollo de MHCCR. Para recrear de la manera más fiable posible el desarrollo natural de la enfermedad metastásica, se apostó por un modelo de inducción tumoral mediante inyección intraesplénica de células tumorales de la línea CC531.

No cabe duda que el mejor modelo para estudiar este fenómeno es el humano, pero por razones obvias, este extremo no es posible. Por lo que el uso de modelos animales de CCR continúa siendo imprescindible en muchos aspectos de la investigación en el momento actual (104).

Entonces, el modelo animal más semejante sería aquel que, de *motu proprio*, desarrolle un CCR a partir del cual deriven MHCCR que puedan ser eliminadas quirúrgicamente mediante RH y, posteriormente, haya una recurrencia de la enfermedad y, así, se estudie el área hepática colonizada por las micrometástasis que se activan tras la RH. Esto sería posible empleando cepas animales que, bien de forma natural o bien porque están genéticamente predispuestos a ello, desarrollen un tumor primario y metástasis posteriores. Sin embargo, esto presenta unos grandes inconvenientes como son los elevados costes de mantenimiento y producción de estos animales y bajas tasas de desarrollo de metástasis en el lugar deseado, hecho que algunos autores reflejan que ocurre con incidencia menor al 1% (105), por lo que no son modelos muy empleados en planteamientos experimentales similares al propuesto en este trabajo.

Por otro lado, también se podría inducir el desarrollo de tumores primarios, y sus posteriores metástasis, empleando agentes carcinogénicos como la dimetilhidrazina (DMH) y sus metabolitos N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanina (MNNG), N-metil-N-nitrosourea (MNU) y Azoximetano (AOM) (106). Sin embargo, presenta el inconveniente de que las metástasis originadas por el empleo de estos compuestos tienen una historia natural diferente (106) y no son aptos para el estudio de sus procesos de formación, además también tardan mucho en desarrollarse y se dan con poca frecuencia, por lo que en general precisan del uso de un elevado número de

animales. Además hay que añadir el riesgo que corre el investigador al exponerse a sustancias susceptibles de ocasionarle lesiones neoplásicas.

Otro modelo validado, e incluso también empleados de forma habitual en nuestro Grupo, es la inyección subcapsular directa en el parénquima hepático de células de CCR (implantación heterotópica)(15,107,108). Esta técnica es mucho más sencilla, tanto a nivel de procedimientos como del tiempo empleado en realizar la inyección, pero no resulta adecuada para este estudio, ya que no se consigue un pool de células circulantes en el árbol vascular, que imiten a las micrometástasis que pudieran quedar o liberarse tras la RH de MHCCR y, tampoco ocurren los procesos implicados en la implantación de las células tumorales (109).

Por todo lo anteriormente expuesto, el modelo elegido y empleado en este trabajo, la inyección intraesplénica, es uno de los más validados para la inducción tumoral. Mediante esta vía de administración, el porcentaje de animales en los que se consigue provocar el desarrollo MHCCR es muy heterogéneo, desde apenas el 20% hasta el 100% de los casos, según autores (110,111). En nuestro caso, el 100% de los animales a los que se indujo el desarrollo tumoral, resultaron portadores de MHCCR. Este modelo de administración heterotópica de células tumorales emula de una forma adecuada los procesos implicados en la diseminación hematogena por vena porta de las células metastásicas del CCR, así como los posteriores procesos de extravasación, anidamiento y desarrollo de los implantes tumorales.

Hay que tener en cuenta, si se recurre a modelos de inducción tumoral por implantación de células tumorales, bien sea de forma orto o heterotópica, realizar una correcta selección de línea celular a emplear, que sea biológicamente compatible con el modelo animal (110). A este respecto podremos optar entre isotrasplantes, referidos a modelos desarrollados mediante la inoculación de células o tejidos tumorales de origen animal en otro animal con idéntico fondo genético (112) o xenotrasplantes (distinto origen genético entre células y animal, diferente especie).

En el presente estudio se ha trabajado con células de CCR de rata de la línea CC531, singénicas con la cepa de ratas usada como modelo animal, WAG/RijHsd. El injerto rara vez es rechazado y son rentables y convenientes en estudios con un planteamiento similar al nuestro (113). Sin embargo, estos modelos carecen de la

heterogeneidad genética de los tumores humanos (114). Sin embargo, según Robertson et al, la precisión biológica de un modelo de cáncer que usa células de CCR humano para desarrollar metástasis en un hígado de rata debe ser cuestionada (115), ya que las diferencias entre arquitectura hepática y mecanismos homeostáticos en una rata y un ser humano es probable que produzca una imagen distorsionada del desarrollo metastásico.

6.2. EFECTO DE LA RH PARCIAL SOBRE EL DESARROLLO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS

En el presente estudio se ha demostrado como la resección hepática tuvo efecto potenciador del desarrollo de MHCCR. Estos resultados guardan relación con los obtenidos por Panis et al, en un modelo de inducción intraportal, en los que tres veces más de ratas desarrollaron MHCCR en el grupo sometido a RH del 70%, en comparación con el grupo control no hepatectomizados (20% vs. 60%, $p < 0,05\%$) (116).

En la misma línea, estudios previos realizados por investigadores de nuestro Grupo, empleando células de rhabdomyosarcoma, revelaron que la realización de una hepatectomía parcial del 40% en ratas que recibieron una inyección intraesplénica de las células tumorales, similar a la realizada en el presente estudio, indujo un mayor crecimiento tumoral en comparación a aquellas en las que no fueron sometidas a tratamiento quirúrgico alguno. Analizado el porcentaje de área invadida por metástasis en cada uno de los lóbulos hepáticos, se pueden observar resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Se aprecia un incremento estadísticamente significativo en los LPM y LC y un aumento no estadísticamente significativo en el LLD, al igual que en el presente trabajo (117).

Krause et al. trabajando con el mismo modelo animal y la misma línea celular, obtuvieron el mismo incremento al comparar el ATR (%) hepatectomizado (2,8 vs 2,5) (118).

En otro estudio realizado por Harun et al., se analizó el efecto de una hepatectomía del 40 o 70% tras la inoculación intraesplénica de células de CCR. La inducción se realizó en el momento de la hepatectomía o 6 días después, para evaluar los efectos

de tanto la fase temprana como tardía de la regeneración hepática. La RH del 40% no interfirió significativamente en el desarrollo metastásico, no así con la RH del 70%, que sí que presentó diferencias significativas. Este estudio evidenció que los factores de la regeneración hepática que principalmente influyen en el desarrollo de metástasis (tanto intra como extrahepáticas), son aquellos implicados en las fases tardías de la misma (64).

Finalmente, en otro estudio realizado por el mismo grupo demostraron que, tras una RH del 70%, el incremento de la masa tumoral se debía a una sobrerregulación de c-met en el área circundante a las metástasis hepáticas (5).

Estos resultados apoyan la validez de nuestro modelo y confirman los datos observados en el presente trabajo experimental.

6.2.1. CONTROL DE LAS RUTAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS

Como se ha podido ver tras la revisión bibliográfica realiza, son múltiples las moléculas y rutas de señalización celular implicadas en el desarrollo de la enfermedad metastásica. Estos factores están íntimamente relacionados con la regeneración hepática, tan necesaria tras la RH con intención curativa. Hoy en día la cirugía de las metástasis es el único tratamiento curativo y por lo tanto necesario, pero, como se ha observado, también parece favorecer el crecimiento de metástasis subclínicas.

Es por ello que se hace necesario el desarrollo de opciones terapéuticas que limiten este efecto no deseado de la cirugía. Numerosos agentes antiangiogénicos se han desarrollado contra diversos tipos de tumores, y muchos otros están bajo investigación clínica. Por ejemplo, el bevacizumab (Avastin(R), un anticuerpo monoclonal, está aprobado para el tratamiento de CCR metastásico y el sunitinib, un inhibidor de la TK, para tumores del estroma gastrointestinal (48). Sin embargo, parece que los fármacos actuales de esta categoría muestran una eficacia limitada en régimen de monoterapia, además de producir distorsión en el resto de tejidos sanos del organismo (119).

Estos tratamientos actúan sobre moléculas implicadas en los primeros estadios de la regeneración hepática. Pero, sin embargo, son las etapas finales de la regeneración hepática las que estimulan en mayor medida el crecimiento de MHCCR, y contra estas etapas aún no existen terapias desarrolladas (64). Tales factores podrían ser las MMP, específicamente MMP-2 y MMP-9 (120). Las MMP están involucradas en la descomposición y remodelación de la MEC durante la regeneración hepática. Se liberan al final de la fase inicial y la reestructuración de MEC continúa hasta la última fase. Se ha demostrado, en estudios previos, que estas proteínas enzimáticas participan en la promoción de metástasis hepáticas y el crecimiento tumoral, ya que el proceso de remodelación puede proporcionar el andamiaje para la implantación de células tumorales.

Cabe destacar también la redundancia de muchas de las rutas de señalización que intervienen en la regeneración hepática, y también en el control de las metástasis, y, por tanto, no hay un solo factor que en caso de ser anulado impida el desarrollo metastásico (48). Es por ello que, en caso de querer limitar la estimulación de metástasis, habrá que hacerlo desde diferentes frentes utilizando terapias dirigidas contra más de un factor implicado en las rutas de señalización estimuladas durante el acto quirúrgico de resección de las metástasis.

Por último, destacar otros factores perioperatorios no analizados en el presente estudio que también se han visto que podrían contribuir a la progresión de las micrometástasis ya presentes en el parénquima hepático. Entre ellos destacan la estimulación del sistema inmune como respuesta al estrés, liberación de prostaglandinas antiinflamatorias, la inmunosupresión postquirúrgica, la anestesia, anticoagulación (121), analgesia y la hipotermia (122).

7. CONCLUSIONES

A tenor de lo expuesto en este trabajo, podemos concluir que:

- En nuestro modelo experimental se ha observado que la RH para el tratamiento de las MHCCR favorece el crecimiento de micrometástasis circulantes.
- A pesar de que múltiples estudios han mostrado que ciertos aspectos de la regeneración hepática tienen efecto en la recidiva tumoral post-hepatectomía, muchos procesos subyacentes siguen siendo poco conocidos.
- Muchos de los factores implicados en la regeneración hepática tras la RH son comunes a las rutas de señalización celular implicadas en el desarrollo metastásico.
- Ha quedado claro la importancia de las moléculas que regulan la fase tardía de la regeneración hepática y su papel clave en la progresión de la enfermedad metastásica de asiento hepático y, por lo tanto, las aplicaciones terapéuticas deben dirigirse a ellas, sin afectar la fase temprana del proceso regenerativo.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Stewart B, Kleihues P. World cancer report. IARC Press. Lyon; 2003.
2. Hermanek Jr P., Wiebelt H, Riedl S, stainmer D HP. Long-term results of surgical therapy of colon cancer. *Chirurg*. 1994;65(Results of the colorectal cancer study group (German)):287–97.
3. Boyle P, Langman JS. ABC of CCR. 2000;321(September):805–8.
4. Margonis GA, Kim Y, Spolverato G, Ejaz A, Gupta R, Cosgrove D, et al. Association between specific mutations in KRAS codon 12 and colorectal liver metastasis. *JAMA Surg*. 2015;150(8):722–9.
5. Harun N, Costa P, Christophi C. Tumour growth stimulation following partial hepatectomy in mice is associated with increased upregulation of c-Met. *Clin Exp Metastasis*. 2013;31(1):1–14.
6. Estadística IN de. Fallecidos por cáncer en España. 2018;2018.
7. Hunter D, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. 1994;331(25).
8. Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA. Cáncer colorrectal (CCR): Alteraciones genéticas y moleculares. *Gac Med Mex*. 2014;150(2):154–64.
9. Hisamuddin IM, Yang VW. Genetics of Colorectal Cancer. *Medscape Gen Med*. 2004;6(3):13.
10. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *Clin Biochem Rev*. 2010 May;31(2):31–8.
11. Jover R. Poliposis adenomatosa familiar. 2011;29(10):625–35.
12. Wilmink ABM. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(4):483–93.
13. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, et al. Lower Cancer Incidence in Amsterdam-I Criteria Families Without Mismatch Repair Deficiency: Familial Colorectal Cancer Type X. *JAMA*. 2005;293(16):1979–85.
14. Clemens S, Stephan B, Hendrik EJ, Andre F, Mario B, Abdou ES, et al. Genetic investigation of DNA-repair pathway genes PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 and MTH1 in sporadic colon cancer. *Int J Cancer*.

- 2007;121(3):555–8.
15. Herrero de la Parte B. Hipertermia magnética antitumoral mediada por nanopartículas magnéticas RGD en el tratamiento de metástasis hepáticas en un modelo experimental murino. Universidad del País Vasco; 2017.
 16. Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343(2):78–85.
 17. Desai D, Desai N. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: A critical analysis. *World J Gastrointest Endosc*. 2014;6(11):541–8.
 18. Dias SC, Ribeiro LE. Crohn's disease: risk factor for colorectal cancer. *J Coloproctology*. 2017;37(1):55–62.
 19. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol*. 2013;43(4):973–84.
 20. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. 2009;125(1):171–80.
 21. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ Br Med J*. 2000;321(7264):805.
 22. Kune GA, Bannerman S, Watson LF. Attributable risk for diet, alcohol, and family history in the Melbourne colorectal cancer study. *Nutr Cancer*. 1992;18(3):231–5.
 23. Research WC, A. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. In: AICR. Washington, DC: Elsevier; 1997. p. 523–6.
 24. Hou N, Huo D, Dignam JJ. Prevention of colorectal cancer and dietary management. *Chinese Clin Oncol*. 2013;2(2):13.
 25. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.6).
 26. Arem H, Moore SC, Park Y, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann M, et al. Physical activity and cancer-specific mortality in the NIH-AARP Diet

- and Health Study cohort. *Int J Cancer*. 2014;135(2):423–31.
27. Cummings C, Linda D, Jonathan P, Gregory SC. Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2007;109(4):718–26.
 28. Grundmann R, Hermanek P, Merkel S, Germer C-T, Hauss J, Henne-Bruns D, et al. Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow. Vol. 133, *Zentralblatt für Chirurgie*. 2008. 267-284 p.
 29. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg*. 2006;244(2):254–9.
 30. Hackl C, Mori A, Moser C, Lang SA, Dayoub R, Weiss TS, et al. Effect of heat-shock protein-90 (HSP90) inhibition on human hepatocytes and on liver regeneration in experimental models. *Surgery*. 2010;147(5):704–12.
 31. Mantke R, Schmidt U, Wolff S, Kube R, Lippert H. Incidence of synchronous liver metastases in patients with colorectal cancer in relationship to clinicopathologic characteristics. Results of a German prospective multicentre observational study. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38(3):259–65.
 32. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–11.
 33. Rabinel P, Dousse D, Muscari F, Suc B. Management of liver cancer. The Surgeon's point of view. *Reports Pract Oncol Radiother*. 2017;22(2):176–80.
 34. Van den Eynde M, Hendlisz A. Treatment of colorectal liver metastases: a review. *Rev Recent Clin Trials*. 2009;4:56–62.
 35. House MG, Ito H, Gönen M, Fong Y, Allen PJ, DeMatteo RP, et al. Survival after Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer: Trends in Outcomes for 1,600 Patients during Two Decades at a Single Institution. *J Am Coll Surg*. 2018;210(5):744–52.
 36. Adam R. Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Ann Oncol*. 2003;14(90002):13ii–16.
 37. Ruers T, Bleichrodt RP. Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *Eur J Cancer*. 2002;38(7):1023–33.
 38. Institute national cancer. NCI Dictionary of Cancer Terms [Internet]. 2018.

Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/micrometastasis>

39. Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, et al. Angiostatin : A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. 1994;79:315–28.
40. Naumov GN, Folkman AEJ. Tumor dormancy due to failure of angiogenesis : role of the microenvironment. 2009;51–60.
41. Romano D, Monica T, Pinuccia V, Grazia GA, Moliterni M, Zambetti G, et al. Local recurrences following mastectomy: support for the concept of tumor dormancy. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86 1:45–8.
42. Weiss L. Metastatic Inefficiency. In: Vande Woude GF, Klein GBT-A in CR, editors. Academic Press; 1990. p. 159–211.
43. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers a F, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998;153(3):865–73.
44. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1:149.
45. Govaert KM, Jongen JMJ, Kranenburg O, Borel Rinkes IHM. Surgery-induced tumor growth in (metastatic) colorectal cancer. *Surg Oncol.* 2017;26(4):535–43.
46. Harriet W, Robert V, Klaus P. Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS.* 2008;116(7-8):754–70.
47. Townson JL, Chambers AF. Dormancy of Solitary Metastatic Cells. *Cell Cycle.* 2006;5(16):1744–50.
48. Paschos KA, Bird NC. Liver regeneration and its impact on post-hepatectomy metastatic tumour recurrence. *Anticancer Res.* 2010;30(6):2161–70.
49. Yokoyama N, Shirai Y, Ajioka Y, Nagakura S, Suda T, Hatakeyama K. Immunohistochemically detected hepatic micrometastases predict a high risk of intrahepatic recurrence after resection of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer.* 2002;94(6):1642—1647.

50. Ikawa K, Terashima Y, Sasaki K, Tashiro S. Genetic Detection of Liver Micrometastases That Are Undetectable Histologically. *J Surg Res.* 2002;106(1):124–30.
51. Flores Moreno S, Villegas Portero R. Efectos de los factores de crecimiento tisular tras la resección mayor del hígado . Agencia de evaluación de tecnologías sanitarias de andalucía (AETSA). 2007. 2-48 p.
52. Dong Z, Wei H, Sun R, Tian Z. The Roles of Innate Immune Cells in Liver Injury and Regeneration. 2007;(4).
53. Cantz T, Manns MP, Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* 2008;331(1):271–82.
54. Taub R. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):836–47.
55. Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology.* 2005;128(2):503–6.
56. Rozga J. Hepatocyte proliferation in health and in liver failure. *Med Sci Monit.* 2002;8(2):RA32-8.
57. Christophi C, Harun N, Fifis T. Liver regeneration and tumor stimulation-A review of cytokine and angiogenic factors. *J Gastrointest Surg.* 2008;12(5):966–80.
58. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: Critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176(1):2–13.
59. Mangnall D, Smith K, Bird NC, Majeed AW. Early increases in plasminogen activator activity following partial hepatectomy in humans. *Comp Hepatol.* 2004;3:1–10.
60. Apte U, Gkretsi V, Bowen WC, Mars WM, Luo J-H, Donhamsetty S, et al. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology.* 2009;50(3):844–51.
61. Kim T, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE, Michalopoulos GK. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology.* 2003;26(4):896–904.
62. Wang H, Keiser JA. Hepatocyte Growth Factor Enhances MMP Activity in Human Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272(3):900–

- 5.
63. Yoon SS, Kim SH, Gonen M, Heffernan NM, Detwiller KY, Jarnagin WR, et al. Profile of Plasma Angiogenic Factors Before and After Hepatectomy for Colorectal Cancer Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(3):353–62.
 64. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver Regeneration Stimulates Tumor Metastases. *J Surg Res*. 2007;138(2):284–90.
 65. Dhanwant G, Gareth M, Judy W, J. TG, A. LJP, Rajendra PK. Surgical technique and systemic inflammation influences long-term disease-free survival following hepatic resection for colorectal metastasis. *J Surg Oncol*. 2008;98(5):371–6.
 66. Li B, Ping MG, Ping CC. Effects of inflammatory cytokines on the recurrence of liver cancer after an apparently curative operation. *J Dig Dis* [Internet]. 2007 Jul 23;8(3):154–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1443-9573.2007.00292.x>
 67. Kmiec Z. Cooperation of Liver Cells in health and disease. 2001;161(161):1–151.
 68. Zarnegar R, Michalopoulos G. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol*. 1995 Jun 1;129(5):1177–80.
 69. Lamszus K, Jin L, Fuchs A, Shi E, Chowdhury S, Yao Y, et al. Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. Vol. 76, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1997. 339-353 p.
 70. Yamagami H, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y. Detection of Serum and Intrahepatic Human Hepatocyte Growth Factor in Patients with Type C Liver Diseases. *Intervirology*. 2001;44(1):36–42.
 71. Li H-W, Shan J-X. Effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on the invasion of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol*. 2005;11(25):3877–81.
 72. F. MF, J. PC, Zamaneh K, S. RJ, D. SP, Ulrich R, et al. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology*. 2005;41(4):857–67.
 73. Tamatani T, Hattori K, Iyer A, Tamatani K, Oyasu R. Hepatocyte growth

- factor is an invasion/migration factor of rat urothelial carcinoma cells in vitro. *Carcinogenesis*. 1997;20:957–962.
74. Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y, Nakamura T. Induction of Hepatocyte Growth Factor in Fibroblasts by Tumor-derived Factors Affects Invasive Growth of Tumor Cells: In Vitro Analysis of Tumor-Stromal Interactions. *Cancer Res*. 1997;57(15):3305 LP-3313.
 75. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int*. 2001;59(6):2023–38.
 76. Romero-Gallo J, Sozmen EG, Chytil A, Russell WE, Whitehead R, Parks WT, et al. Inactivation of TGF- β signaling in hepatocytes results in an increased proliferative response after partial hepatectomy. *Oncogene*. 2005;24:3028.
 77. Oberhammer F, Bursch W, Parzefall W, Breit P, Erber E, Stadler M, et al. Effect of Transforming Growth Factor β on Cell Death of Cultured Rat Hepatocytes. *Cancer Res*. 1991 May 1;51(9):2478 LP-2485.
 78. Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(6):425–31.
 79. Lananh NN, Momoko HF, LAwrence AW, Anthony PN, Matthew SH, Jean SC, et al. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology*. 2006;45(1):31–41.
 80. Wipff P-J, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1 – An intimate relationship. *Eur J Cell Biol*. 2008;87(8):601–15.
 81. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1350–8.
 82. Sup SK, Ho KK, Sup HW, Bum PE. Elevated serum levels of transforming growth factor- β 1 in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 2000;85(3):554–61.
 83. Teramoto T, Kiss A, Thorgeirsson SS. Induction of p53 and Bax during TGF- β 1 Initiated Apoptosis in Rat Liver Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(1):56–60.
 84. Tsushima H, Ito N, Tamura S, Matsuda Y, Inada M, Yabuuchi I, et al. Circulating Transforming Growth Factor β 1 as a Predictor of Liver Metastasis after Resection in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(5):1258 LP-

- 1262.
85. Biswas S, Guix M, Rinehart C, Dugger TC, Chytil A, Moses HL, et al. Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1305–13.
 86. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer – a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2018;11(11):S44–51.
 87. Maharaj ASR, Saint-Geniez M, Maldonado AE, D’Amore PA. Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *Am J Pathol.* 2018 Apr 14;168(2):639–48.
 88. Marie BA, D.J. B, J.H. H. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2007;9(4):777–94.
 89. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:392.
 90. Michalopoulos GK, Khan Z. Liver Regeneration, Growth Factors, and Amphiregulin. *Gastroenterology.* 2005 Feb;128(2):503–6.
 91. Park D Il, Kang MS, Oh SJ, Kim HJ, Cho YK, Sohn C Il, et al. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2006;22(5):491.
 92. Zhu Z. Targeted cancer therapies based on antibodies directed against epidermal growth factor receptor: status and perspectives. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28:1476.
 93. Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D. Circulating Insulin-like Growth Factor-I Levels Regulate Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Res.* 2002;62(4):1030 LP-1035.
 94. Long L, Navab R, Brodt P. Regulation of the Mr 72,000 Type IV Collagenase by the Type I Insulin-like Growth Factor Receptor. *Cancer Res.* 1998;58(15):3243 LP-3247.
 95. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1789–97.
 96. Laurent B, Frédérique L, Sylvie F, Hiroyasu E, Alessandro W, L. AG. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like

- growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*. 1999;85(1):117–23.
97. Haruyama T, Ajioka I, Akaike T, Watanabe Y. Regulation and Significance of Hepatocyte-Derived Matrix Metalloproteinases in Liver Remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272(3):681–6.
 98. W. OE, Xiaodan R, D. MS, L. WR, P. DM, J. JK, et al. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2006;44(3):540–9.
 99. Paschos KA, Canovas-Jorda D, C Bird N. Enzymatic function of multiple origins regulates the progression of colorectal cancer and the development of metastases. Vol. 13, *Hippokratia*. 2009. 23-31 p.
 100. Overall CM, Dean RA. Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(1):69–75.
 101. Illemann M, Bird N, Majeed A, Sehested M, Laerum OD, Lund LR, et al. MMP-9 Is Differentially Expressed in Primary Human Colorectal Adenocarcinomas and Their Metastases. *Mol Cancer Res*. 2006;4(5):293 LP-302.
 102. Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491–4.
 103. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:161.
 104. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation. *Eur J Cancer*. 2018;40(6):852–7.
 105. Chandra M, Frith CH. Spontaneous neoplasms in aged CD-1 mice. *Toxicol Lett*. 1992;61(1):67–74.
 106. Carmona FR. Cáncer de colon experimental: Caracterización del modelo mediante marcadores tumorales y moléculas de adhesión. Universidad de Salamanca; 2009.
 107. Arriortua OK, Garaio E, Herrero de la Parte B, Insausti M, Lezama L, Plazaola F, et al. Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal

- liver metastases. *Beilstein J Nanotechnol.* 2016;7:1532–42.
108. Echevarría-Uraga JJ, García-Alonso Montoya I, Plazaola F, Insausti M, Etxebarria-Loizate N, Herrero de la Parte B, et al. Perfusion of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles into experimental liver metastases. The 2012 ESSR Congress, Lille, France. In: *European Surgical Research.* 2013. p. 80–251.
 109. Flatmark K, Mælandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad Ø. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *Eur J Cancer.* 2004;40(10):1593–8.
 110. Robertson JHP, Yang SY, Iga AM, Seifalian AM, Winslet MC. An in vivo rat model for early development of colorectal cancer metastasis to liver. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(6):447–57.
 111. Kasuya K, Nagakawa Y, Hosokawa Y, Sahara Y, Takishita C, Nakajima T, et al. Liver metastasis is established by metastasis of micro cell aggregates but not single cells. Vol. 14, *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2017. p. 221–7.
 112. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis.* 2005;26(3):513–23.
 113. Oh BY, Hong HK, Lee WY, Cho YB. Animal models of colorectal cancer with liver metastasis. *Cancer Lett.* 2017;387:114–20.
 114. Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. Barbacid M, Berns A, editors. *Mol Oncol.* 2013;7(2):283–96.
 115. Robertson JHP, Sarkar S, Yang SY, Seifalian AM, Winslet MC. In vivo models for early development of colorectal liver metastasis. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(1):1–12.
 116. Panis Y, Ribeiro J, Chrétien Y, Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg.* 1992;79(3):221–3.
 117. García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Portugal V, Castro B, Caramés J, et al. [Effect of hepatic resection on development of liver metastasis]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2003;95(11):771–6, 765–70.
 118. Krause P, Flikweert H, Monin M, Seif Amir Hosseini A, Helms G, Cantanhede G, et al. Increased growth of colorectal liver metastasis following

- partial hepatectomy. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(5):681–93.
119. Cortés-Funes H. The role of antiangiogenesis therapy: Bevacizumab and beyond. *Clin Transl Oncol*. 2009;11(6):349–55.
 120. Yoshito M, Sonshin T, Takashi A. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol*. 2002;80(2):105–10.
 121. Nakao T, Arai S, Kaido T, Mori A, Murata T, Matsumori A, et al. Heparin accelerates liver regeneration following portal branch ligation in normal and cirrhotic rats with increased plasma hepatocyte growth factor levels. 2002;37:87–92.
 122. Behrenbruch C, Shembrey C, Paquet S, Christina F, Hyun M, Cho J, et al. Surgical stress response and promotion of metastasis in colorectal cancer : a complex and heterogeneous process. *Clin Exp Metastasis*. 2018;0(0):0.