

Efecto de la resección hepática sobre el desarrollo de metástasis en el hígado

I. García-Alonso, T. Palomares, A. Alonso¹, V. Portugal, B. Castro¹, J. Caramés y J. Méndez

Laboratorio de Cirugía Experimental. ¹Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas. Facultad de Medicina y Odontología. UPV/EHU. Vizcaya

RESUMEN

Los estadios iniciales de la enfermedad metastática requieren de la estimulación de factores de crecimiento del propio huésped. Dichos factores pueden encontrarse aumentados en ciertas situaciones clínicas, como la resección parcial del hígado metastatizado. Dada la importancia de los factores hepatotróficos en la regeneración hepática, en el presente estudio se ha investigado el efecto de la hepatectomía parcial sobre el desarrollo de las micrometástasis residuales y de la enfermedad neoplásica global. Se ha utilizado un modelo murino en el que tras la inducción subcutánea de un tumor de rhabdomyosarcoma en ratas WAG, estas fueron sometidas a resección del tumor primario, hepatectomía del 40% o a ambos actos quirúrgicos. La influencia de dichos procedimientos sobre la enfermedad tumoral fue analizada en los días 25 y 35 post-inoculación tumoral, evaluando además la tasa regenerativa hepática. La tumorectomía y la hepatectomía, practicadas de forma aislada, produjeron un aumento de las adenopatías regionales, sin modificar la evolución de las metástasis hepáticas. Sin embargo, el tratamiento combinado de tumorectomía y hepatectomía produjo un aumento del proceso metastático. Así, además de producirse una mayor extensión global de la enfermedad (pulmonar, mediastínica y retroperitoneal), se incrementó un 300% el número de metástasis hepáticas. Este aumento de la carga metastática hepática coincidió con un incremento de la respuesta regenerativa hepatocitaria que casi duplicó al del grupo con hepatectomía sola. En conclusión, la hepatectomía sola o en combinación con la resección del tumor primario puede originar una intensificación de la enfermedad tumoral, de extensión local y metastática.

Palabras clave: Hepatectomía parcial. Tumorectomía. Metástasis hepáticas. Regeneración hepática.

Recibido: 09-04-03.

Aceptado: 25-06-03.

Correspondencia: Ignacio García-Alonso Montoya. Dpto. de Cirugía y Radiología y MF. Fac. de Medicina y Odontología. Bº Sarriena s/n. 48940 Leioa, Vizcaya. Telf.: 946 012 816. Fax.: 946 012 781. e-mail: ocpga-moi@lg.ehu.es.

El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto del F.I.S. 144.327-0364/99

García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Portugal V, Castro B, Caramés J, Méndez J. Effect of hepatic resection on development of liver metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 765-770.

INTRODUCCIÓN

Desde que hace más de medio siglo, Higgins y cols. (1) demostraran la capacidad regenerativa del hígado hasta la recuperación de la masa inicial del órgano tras la realización de una hepatectomía parcial, la generalización de la resección hepática como alternativa terapéutica de la enfermedad metastática localizada, ha abierto un importante tema de investigación en cirugía experimental. El interés de este campo de investigación se ha visto incrementado tras el aislamiento en los últimos años de las sustancias implicadas en dicho proceso de regeneración hepática (2-3). Si bien existe un factor de crecimiento específico hepatocitario (factor de crecimiento de hepatocitos, HGF), se han ido paulatinamente descubriendo una plétora de factores de crecimiento (GF) que, igualmente, regulan la proliferación hepatocitaria, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante alfa y el beta (TGF) y el factor de crecimiento fibroblasto básico (FGFb), entre otros (4,5).

Si bien la cirugía puede ser considerada una de las terapias más efectivas para el tratamiento de las metástasis hepáticas, la recurrencia de la enfermedad tumoral es un fenómeno común. Dicha recidiva se produce, habitualmente, tras el crecimiento de las micrometástasis presentes en el hígado remanente (6). En este desarrollo metastático se encuentran implicados, al menos, dos importantes procesos biológicos dependientes, asimismo, de la presencia de GF: la proliferación celular y la angiogénesis. Gracias a la existencia en la superficie de la membrana plasmática de receptores específicos para GF

secretados por las células neoplásicas (GF autocrinos) o por las propias del órgano huésped (GF paracrinos), las células tumorales reciben la señal mitogénica necesaria que les permite dividirse de forma activa, dando lugar a un aumento de la masa tumoral (7-9). Sin embargo, ello no sería posible sin el adecuado soporte conectivo-vascular que sustente este incremento proliferativo. Dicho soporte, puede ser inducido por células tumorales o por las propias células del órgano invadido, mediante la secreción al medio de GF neoangiogénicos (VEGF) y GF estimuladores de la proliferación de los fibroblastos (FGFb), entre otros (10).

En esta comunicación bidireccional entre las células tumorales y las células del hígado (11), se encuentran implicados GF relacionados con el proceso de regeneración hepática, como son los anteriormente citados HGF, FGFb, EGF, VEGF, etc. (12-14). De este modo, los factores de crecimiento liberados durante la hepatectomía parcial estimularían tanto la proliferación hepatocitaria como el desarrollo de las células tumorales. Ante esta premisa, parece necesario, por tanto, conocer el efecto que el acto quirúrgico, para el control de metástasis localizada, pueda ejercer sobre la posterior evolución tumoral.

En base a lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se ha investigado la influencia que la resección parcial del hígado metastatizado tiene sobre el desarrollo de las micrometástasis residuales y la evolución de la enfermedad neoplásica en su conjunto, de cara a disponer de un buen modelo en el que ensayar medidas terapéuticas que contrarresten dicha influencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado ratas WAG, machos de 8 semanas (150 ± 20 g), estabuladas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, con comida y bebida "ad libitum", y siguiendo en todo momento la "Guía nacional española para el cuidado del animal en experimentación y otros fines científicos" (Real Decreto 223/88). Como modelo tumoral se utilizó la línea celular de rhabdomyosarcoma (singenética para la ratas WAG) S4MH, con alta afinidad para el desarrollo de metástasis hepáticas. Las células ($2,5 \times 10^3$ células, resuspendidas en $250 \mu\text{l}$ de PBS) fueron inoculadas por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales.

Tras la inoculación tumoral, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro grupos de 20 animales: control, tumorectomía (con extirpación completa de la lesión tumoral primaria el día 23 post-inoculación tumoral), hepatectomía parcial del 40% (exéresis del lóbulo lateral izquierdo el día 23 post-inoculación tumoral), y grupo sometido a ambos procesos (tumorectomía y hepatectomía). Para facilitar la recuperación de los animales, al finalizar el acto quirúrgico se administraron 5 ml de suero glucosado 5% i.p. La mitad de los

animales de cada grupo fueron sacrificados en dos momentos evolutivos diferentes (días 25 ó 35 post-inoculación tumoral, respectivamente), mediante sección medular alta bajo anestesia con éter. Se registró la existencia y/o número de metástasis en diferentes localizaciones (inguinal, axilar, retroperitoneal, intraperitoneal, mediastínica, pulmonar y hepática), así como el peso del animal, del hígado y –en su caso– del tumor primario. Por otro lado, se realizó un análisis de la capacidad regenerativa hepática mediante microespectrofotometría sobre cortes histológicos del lóbulo paramediano, extraído de los animales sacrificados en el día 25 post-inoculación, y teñidos con colorante de Schiff (reacción de Feulgen).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el test exacto de Fisher para la comparación de la frecuencia de aparición de metástasis ganglionares, y aplicando el test de la t de Student para el resto de los parámetros cuantitativos.

RESULTADOS

Efecto de la tumorectomía sobre la evolución de la enfermedad metastática

La resección del tumor primario fue seguido de un aumento significativo de la frecuencia de metástasis ganglionares axilares e inguinales. Como puede observarse en la tabla I, mientras en el grupo control no se apreciaron metástasis ganglionares en el día 25 de evolución, el 70% de los animales a los que fue practicada la tumorectomía presentó adenopatías axilares ipsilaterales ($p < 0,005$). En el día 35 de evolución, dicho porcentaje se incrementó hasta el 100% y, asimismo, el 90% de estos animales tenían también adenopatías inguinales ipsilaterales, en comparación al 10% de los animales del grupo control ($p < 0,005$). En cambio, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de metástasis ganglionares contralaterales, intra y retroperitoneales, mediastínicas y pulmonares (Tabla I). De igual modo, tampoco se produjeron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo en el que se practicó la tumorectomía, ni en el número de focos metastáticos hepáticos (5,2 vs 5,1 focos macroscópicos; Tabla II), ni en la distribución de los mismos entre los diferentes lóbulos del hígado (Tabla III).

En lo que respecta al porcentaje de hepatocitos en regeneración, y tomando como referencia los valores normales de regeneración basal hepática ($2,5\% \pm 1,6$), la tumorectomía no modificó de forma significativa dicho porcentaje ($1,7\% \pm 1,9$; Tabla IV). Por otro lado, en comparación al grupo control, la resección del tumor primario tampoco alteró de forma significativa el porcentaje del peso hepático relativo al peso global del animal (Tabla V).

Tabla I. Evolución de las metástasis

| Localización metastática | Control | | Tumorectomía | | Hepatectomía | | Tumorectomía+Hepatectomía | |
|--------------------------|---------|--------|--------------|--------|--------------|--------|---------------------------|--------|
| | Día 25 | Día 35 | Día 25 | Día 35 | Día 25 | Día 35 | Día 25 | Día 35 |
| Inguinal | | | | | | | | |
| ipsilateral | 0 | 10 | 0 | 90* | 0 | 90* | 0 | 90* |
| contralateral | 0 | 10 | 0 | 20 | 0 | 50 | 0 | 20 |
| Axilar | | | | | | | | |
| ipsilateral | 0 | 10 | 70* | 100** | 70* | 100** | 90** | 90* |
| contralateral | 0 | 10 | 0 | 20 | 0 | 40 | 0 | 40 |
| Retroperitoneal | 50 | 100 | 60 | 100 | 70 | 100 | 90 | 100 |
| Intraperitoneal | 0 | 50 | 0 | 60 | 0 | 60 | 0 | 90 |
| Mediastínicas | 0 | 30 | 0 | 40 | 0 | 10 | 0 | 50 |
| Pulmonares | 30 | 90 | 10 | 100 | 30 | 100 | 40 | 100 |

Las cifras expresan el porcentaje de animales en los que se encontraron metástasis macroscópicas en esa localización. Las comparaciones entre cada serie y el grupo control se han realizado con el Test de Fisher: *p<0,005; **p<0,0005.

Tabla II. Número de metástasis hepáticas macroscópicas

| | A: todos los lóbulos hepáticos | | | | B: excluido el lóbulo lateral izquierdo | | | |
|--------------|--------------------------------|------|---------|-------|---|------|---------|-------|
| | Media | DS | Mediana | Rango | Media | DS | Mediana | Rango |
| Control | | 5,17 | 5 | | 2,87 | 2,32 | 3 | |
| Tumorectomía | | 4,26 | 5 | | 3 | 2,55 | 3 | |
| Hepatectomía | | 1,57 | 1,5 | | 1,5 | 1,57 | 1,5 | |
| Tum. + Hep. | | 6,38 | 8 | | 8,62* | 6,38 | 8 | |

En la tabla B se eliminan las metástasis correspondientes al lóbulo lateral izquierdo para facilitar la comparación con las series en las que se practicó hepatectomía parcial. *Indica p<0,05 respecto al grupo control.

Tabla III. Distribución de las metástasis hepáticas macroscópicas en los diferentes lóbulos

| | Mediano | Lateral izq. | Lateral dcho. | Caudado |
|------------------------------|---------|--------------|---------------|---------|
| Distribución masa hepática % | 30% | | | |
| Hígados completos | | | | |
| Control | | | | |
| % metástasis | | | | |
| Tumorectomía | | | | |
| Distribución masa hepática % | 50% | 33% | 17% | |
| Hepatectomía | | | | |
| Hepatectomía | | | | |
| % metástasis | | | | |
| Tum. + Hep. | | | | |

En negrita se recoge el porcentaje de masa que corresponde a cada lóbulo hepático. Para cada grupo experimental se detalla el porcentaje de metástasis macroscópicas que se asentaron en cada lóbulo, así como el número medio de metástasis macroscópicas (junto al error estándar).

Efecto de la hepatectomía parcial sobre la evolución de la enfermedad tumoral

Al igual que lo observado en el grupo de animales tumorectomizados, la hepatectomía dio lugar a un incremento de la frecuencia de las metástasis ganglionares inguinales y axilares. Aún más, dicho aumento fue paralelo

al del grupo tumorectomizado, tanto en el momento evolutivo de aparición de las metástasis inguinales y/o axilares, como en el porcentaje de animales con presencia de dichas metástasis. Así, en el día 25 de evolución, el 70% de los animales hepatectomizados presentó adenopatías axilares ipsilaterales (p < 0,005), siendo dicho porcentaje del 100% en el día 35 de evolución, momento en el cual

el 90% de los animales tenían también adenopatías inguinales ipsilaterales ($p < 0,005$). Por otro lado, también se produjo un aumento de la frecuencia de metástasis ganglionares axilares e inguinales contralaterales (40 y 50%, respectivamente), no alcanzando sin embargo este incremento significación estadística ($p=0,15$; $p=0,07$). Siguiendo con el paralelismo existente con el grupo tumorectomizado, y en lo que se refiere a la frecuencia de metástasis en el resto de las localizaciones anatómicas evaluadas, en el grupo hepatectomizado tampoco se produjo modificación significativa respecto al grupo control.

En el caso particular del número de focos metastáticos en el hígado, en comparación al grupo control y una vez excluido el lóbulo lateral izquierdo en el recuento de los mismos (Tabla IIB), se pudo observar que si bien en el grupo hepatectomizado existió una disminución en el número de metástasis hepáticas, esta no llegó a ser significativa respecto al grupo control ($1,5 \pm 1,6$ vs $2,9 \pm 2,3$; $p = 0,08$). Sin embargo, tal y como se puede apreciar en la tabla III, la distribución de las metástasis entre los diferentes lóbulos hepáticos no se realizó en función del porcentaje de masa hepática correspondiente a cada uno de los mismos, existiendo un mayor tropismo por el lóbulo caudado en los animales hepatectomizados respecto al grupo control (47 vs 14%, respectivamente; $p < 0,05$).

En lo que respecta a la respuesta regenerativa hepática, tal y como cabría esperar, la hepatectomía parcial del 40% produjo un aumento significativo del porcentaje de hepatocitos en regeneración respecto al control ($18,7\% \pm 5,5$ vs $2,5\% \pm 1,6$) (Tabla IV). Por el contrario, la hepatectomía no modificó los parámetros ponderales del hígado ni del tumor primario (Tabla V).

Efecto del tratamiento combinado sobre la evolución de la enfermedad metastática

El tratamiento combinado, tumorectomía y hepatectomía parcial, produjo una intensificación del proceso metastático respecto a los grupos en los que se practicó sólo la tumorectomía o la hepatectomía. En lo referente a las metástasis ganglionares, y tal como ocurría en los grupos

Tabla IV. Porcentaje de hepatocitos en regeneración en animales portadores de tumor y en controles no inoculados

| | Portadores de tumor | | No inoculados | |
|-------|---------------------|--------------|------------------|---------|
| | Hepatectomía | Tumorectomía | Hep. + Tumorect. | Control |
| | | 6,25 | 49,46 | 2,83 |
| | | 2,37 | 47,17 | 4,8 |
| | | 0,73 | 25,02 | 0,7 |
| | | 0,00 | 34,76 | 1,17 |
| | | 2,14 | 28,90 | 2,95 |
| | | 0,75 | 54,75 | |
| | | 0,72 | 12,70 | |
| | | 2,74 | 31,95 | |
| | | 0,00 | 12,53 | |
| Media | | 1,74 | 33,03++ | 2,49 |
| DS | | 1,97 | 15,25 | 1,63 |

Las diferencias son significativas (*) respecto al control o (++) respecto al grupo hepatectomizado, con una $p < 0,05$.

de animales exclusivamente tumorectomizados o hepatectomizados (Tabla I), se produjo un aumento de la frecuencia de las metástasis ganglionares inguinales y axilares ipsilaterales. Aún más, con respecto a estas últimas, en el día 25 de evolución el porcentaje fue incluso mayor que en las otras dos series experimentales (90 vs 70%). Este aumento pudo también apreciarse en lo que se refiere a las metástasis retroperitoneales y pulmonares en el día 25 de evolución, y a las intraperitoneales y mediastínicas en el día 35 de evolución, si bien en estos casos no llegó a alcanzar significación estadística respecto al control.

Sin embargo, fue el hígado el órgano donde pudo observarse en mayor medida la intensificación del desarrollo metastático debida a la combinación tumorectomía-hepatectomía (Tabla IIA). Las diferencias son aún mayores al comparar el número de metástasis tras excluir, en todas las series, las metástasis del lóbulo lateral izquierdo (lóbulo hepatectomizado). Así, respecto al grupo control, en la serie de animales tumorectomizados y hepatectomizados el número de metástasis se incrementó un 300%

Tabla V. Parámetros de evolución clínica

| | Día 25 | | | | Día 35 | | | |
|--------------|-------------|----------|---------------------|------------|-------------|----------|---------------------|------------|
| | Peso hígado | | Peso tumor primario | | Peso hígado | | Peso tumor primario | |
| | Absoluto | Relativo | Absoluto | Relativo | Absoluto | Relativo | Absoluto | Relativo |
| Control | | | 15,5 ± 1,8 | 8,9 ± 0,9 | | | 25,5 ± 5,2 | 14,3 ± 2,5 |
| Tumorectomía | | | | 8,5 ± 1,3 | | | | |
| Hepatectomía | | | 17,9 ± 7,6 | 10,8 ± 4,1 | 4,4 ± 0,8 | | 27,4 ± 6,4 | 14,2 ± 2,7 |
| Tum. + Hep. | | | | 7,9 ± 2,2 | | | | |

Las cifras expresan el peso absoluto en gramos del hígado y del tumor primario y el porcentaje que suponen respecto al peso del animal (medias ± DS). Las diferencias observadas no alcanzan significación estadística.

($p < 0,05$; Tabla IIB). Por otro lado, respecto a los animales exclusivamente hepatectomizados, se produjo una modificación en la distribución lobular de las metástasis, pasando a ser el lateral derecho el lóbulo con mayor porcentaje de metástasis (44%) en vez del lóbulo caudado (20%; Tabla III). De forma paralela al incremento de la carga metastásica hepática, en este grupo de animales se produjo también un aumento muy significativo de la respuesta regenerativa hepatocitaria, que llega casi a duplicar a la del grupo exclusivamente hepatectomizado (33 vs 19%; $p < 0,05$). Por último, el peso hepático relativo del grupo que recibió el tratamiento quirúrgico combinado no se vio modificado en ninguno de los dos momentos evolutivos analizados, respecto al grupo control.

DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra el efecto estimulador del desarrollo metastático secundario al acto quirúrgico para el tratamiento de la enfermedad tumoral a través de una tumorectomía y/o hepatectomía. Ambos tipos de intervenciones quirúrgicas, la resección del tumor primario y la resección de metástasis hepáticas localizadas, se han mostrado eficaces a nivel clínico como tratamiento curativo o paliativo de la enfermedad neoplásica (15-17). Sin embargo, durante ambas manipulaciones quirúrgicas se produce la liberación plasmática de diferentes factores solubles, los cuales pueden estar implicados, además de en los procesos inflamatorios y regenerativos tisulares, en la evolución de la enfermedad tumoral residual o subclínica. En la actualidad, es bien conocida la dependencia de las células tumorales a dichos factores solubles del huésped para su crecimiento y, en particular, para el desarrollo de metástasis, en lo que se ha denominado mecanismo de crecimiento paracrino de la enfermedad metastática (7-9).

El efecto protumoral secundario a la tumorectomía y hepatectomía ha podido ser demostrado gracias a la utilización de un modelo experimental que presenta la ventaja de incluir todas las etapas del proceso metastático (18). En el presente estudio, se ha elegido como momento adecuado para la realización de los dos tipos de procedimientos quirúrgicos el día 23 post-inoculación de las células tumorales, ya que en dicho modelo observamos que en el día 25 comienzan a apreciarse los primeros focos metastáticos en el hígado, coincidiendo, además, con el periodo de máxima regeneración hepatocitaria tras efectuar una hepatectomía parcial del 40%. Así mismo, el día 35 se definió como el de máxima carga metastática, ya que en dicho momento evolutivo todos los animales han desarrollado metástasis en el hígado y la supervivencia es todavía del 90%. Si bien resulta obvio reconocer que el día 23 es un momento demasiado tardío en experimentación animal para la realización de maniobras terapéuticas encaminadas a aumentar la supervivencia de los animales (en el sentido de entender la tumorectomía practicada

como cirugía curativa), se debe tener en cuenta que resulta un momento idóneo para cubrir el objetivo de este trabajo: el estudio del proceso metastático y la repercusión de la intervención quirúrgica en dicho proceso.

Hemos podido observar que cualquiera de los dos actos quirúrgicos, tumorectomía o hepatectomía, realizados de forma aislada provocan un incremento de las metástasis ganglionares, sin modificar el número de metástasis en el pulmón o en el hígado. Sin embargo, con la combinación terapéutica tumorectomía + hepatectomía, es este último órgano el que se ve más ampliamente afectado, incrementándose significativamente el número de metástasis. Este efecto pudiera estar relacionado con la demostrada afinidad de las células S4MH por metastatizar en el hígado, órgano diana en el cual pueden encontrar el microambiente adecuado para su desarrollo, favorecido además por la liberación de los factores de crecimiento tras la hepatectomía. Otros autores han demostrado también el estímulo tumoral tras la hepatectomía parcial, sugiriendo una cierta selectividad por el desarrollo de las células tumorales presentes en el hígado debido a la liberación, tras la resección hepática, de factores de crecimiento como el TGF α , TGF β , FGFb o el HGF, que no estimularían las células presentes, por ejemplo, a nivel pulmonar (12). Entre estos factores, el HGF es el que ha sido más ampliamente implicado en la relación entre la regeneración hepática y el proceso metastático. De hecho, el HGF ha demostrado ser un factor mitogénico para diferentes tipos de poblaciones tumorales que expresan receptores en la superficie de la membrana plasmática para dicho factor (HGF-R) (13,19), estimulando su proliferación a través, entre otros mecanismos, de la activación de la vía fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-kinasa) (20).

Por otro lado, autores como Jiang y cols. han señalado que ciertas células tumorales, además de expresar HGF-R, son capaces de secretar de forma autocrina HGF (14). Aún más, se ha sugerido también que tras una resección tumoral puede producirse, incluso, una sobre-expresión del HGF-R en las células tumorales remanentes (21). De este modo, una tumorectomía concomitante a la hepatectomía, como la realizadas en nuestro estudio, daría lugar a la coexistencia simultánea de un aumento de expresión de HGF-R en las células tumorales y de un aumento de HGF soluble, estimulando así de forma importante el desarrollo metastático. De hecho, en nuestro estudio observamos que, en el grupo en el que fueron practicados ambos procedimientos quirúrgicos, el número de metástasis se incrementó cerca de tres veces respecto a cualquiera de las otras series experimentales. Sin embargo, en el caso de la tumorectomía o la hepatectomía aplicadas de forma aislada, el efecto autocrino o paracrino de los factores de crecimiento derivados de las células normales –fibroblastos, células endoteliales, macrófagos o los hepatocitos–, podría suponer también un estímulo suficiente para propiciar un crecimiento locorregional tumoral más rápido, como es el desarrollo de metástasis ganglionares, lo cual ha sido sugerido también por otros autores (6,7).

Otro resultado destacable del presente trabajo ha sido la distribución anatómica de las metástasis hepáticas, pudiendo observar una localización preferente en uno de los lóbulos hepáticos. Este resultado apoyaría la opinión de aquellos autores que abogan por una resección de las metástasis hepáticas lo más limitada posible. Sin embargo, en base a todo lo anteriormente expuesto y a los trabajos previamente publicados, en los que se sugiere que una resección hepática mínima da lugar a una fuerte estimulación del crecimiento de las células tumorales residuales, mientras una hepatectomía mayor (60%) puede, por el contrario, suprimirla (22,23), hace de aquella, al menos, una opinión discutible.

En conclusión, si bien la escisión quirúrgica puede representar la única alternativa curativa para tumores primarios y metástasis hepáticas, es preciso tomar en consideración el efecto estimulador que dicha intervención puede producir, de forma indirecta, sobre la enfermedad metastásica microscópica. Esto hace, por lo tanto, fundamental el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos que prevengan o anulen dicho efecto protumoral en el tratamiento quirúrgico de la enfermedad neoplásica.

BIBLIOGRAFÍA

- Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202.
- Fausto N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog Growth Factor Res* 1991; 3 (3): 219-34.
- Francavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl TE. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Oncology* 1993 (Supl.): 1-7.
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
- Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 683-6.
- Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 995-8.
- Nicolson GL. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumour metastases to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993; 12: 325-43.
- Menter DG, Herrmann JL, Nicolson GL. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastases. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13: 67-88.
- Radinsky R. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993; 12: 345-61.
- Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, Benoy I, Martin M, De Pooter O, et al. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 843-8.
- Okamoto H, Ohigashi H, Nakamori S, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai L, et al. Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells. Involvement of endothelial cell migration and tumor cell proliferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res* 2000; 32: 374-9.
- Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 1998; 124: 57-64.
- Von Schweinitz D, Faundez A, Teichmann B, Birbaum T, Koch A, Hecker H, et al. Hepatocyte growth-factor-scatter factor can stimulate post-operative tumor-cell proliferation in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* 2000; 85: 151-9.
- Jiang WG, Hallett MB, Puntis MCA. Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastases. *Br J Surg* 1993; 80: 1368-73.
- Suzuki S, Sakaguchi T, Yokoi Y, Kurachi K, Okamoto K, Okamura T, et al. Impact of repeat hepatectomy on recurrent colorectal liver metastases. *Surgery* 2001; 129(4): 421-8.
- Doko M, Zovak M, Ledinsky M, Mijic A, Peric M, Kopljar M, et al. Safety of simultaneous resections of colo-rectal cancer and liver metastases. *Coll Antropol* 2000; 24 (2): 381-90.
- Fujii K, Fujioka S, Kato K, Machiki Y, Kutsuna Y, Ishikawa A, et al. Factors influencing survival in 33 patients undergoing resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47 (33): 607-11.
- Alonso-Varona A, García-Alonso I, Portugal V, San Emeterio E, et al. Desarrollo de un modelo experimental para el estudio de metástasis hepáticas. *Rev Esp Enferm Dig* 1994; 86 (1): 521-25.
- Hamocn KE, Borel IHM, Morgan JR. Hepatocyte growth factor and melanoma: gene transfer studies in human melanocytes. *Melanoma Res* 2001; 11: 89-97.
- Cho MK, Kim SG. Hepatocyte growth factor activates CCAAT enhancer binding protein and cell replication via PI3-kinase pathway. *Hepatology* 2003; 37: 686-95.
- Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kanai T, Umeshita K, Mori T, et al. Hepatocyte growth factor concentrations after liver resection. *Lancet* 1992; 339: 818.
- Yokoyama H, Goto S, Chen CL, Pan TL, Kawano K, Kitano S. Major hepatic resection may suppress the growth of tumours remaining in the residual liver. *Br J Cancer* 2000; 83 (8): 1096-101.
- Rashidi B, An Z, Sun FX, Sassón A, Gamagammii R, Moossa AR, et al. Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 497-500.

Effect of hepatic resection on development of liver metastasis

García-Alonso, T. Palomares, A. Alonso¹ V. Portugal, B. Castro¹, J. Caramés and J. Méndez

Laboratory of Experimental Surgery. ¹Department of Celular Biology and Morphological Sciences. Department of Medicine and Odontology. UPV/EHU. Vizcaya, Spain

ABSTRACT

In the early stages of metastasis, development of the disease is dependent on growth factors produced by the host. There are clinical situations associated with an increase in these factors, such as partial resection of metastasized liver. Given the important role of hepatotrophic factors in liver regeneration, we have studied the effect of partial hepatectomy on the development of residual micrometastases in the liver, and on the neoplastic process as a whole. We used a murine model in which a rhabdomyosarcoma was established by subcutaneous inoculation of syngeneic tumor cells in male Wag rats. Subsequently, the primary tumor was resected and/or a 40% hepatectomy was performed. The effect of these two surgical procedures on the tumor process was analyzed on the 25th and 35th days post-inoculation, and the percentage of regenerating hepatocytes was assessed. Both the tumorectomy and liver resection, when not combined, produced an increase in regional adenopathies without modifying the evolution of metastasis in the liver. However, when tumor excision and partial hepatectomy were performed simultaneously, there was a net increase in the metastatic process. In addition to a rapid spread of the disease (lung, mediastinum, retroperitoneum), the number of liver metastases increased by 300%. This development coincided with a steep rise in the percentage of regenerating hepatocytes, which nearly doubled that of the group subjected only to liver resection. We conclude that liver resection, alone or combined with excision of the primary tumor, may enhance tumor progression, both locally and at the metastatic level.

Key words: Partial hepatectomy. Tumorectomy. Liver metastasis. Liver regeneration.

Received: 09-04-03.

Accepted: 25-06-03.

Correspondence: Ignacio García-Alonso Montoya. Laboratory of Experimental Surgery. UPV/EHU. Bº Sarriena s/n. 48940 Leioa. Vizcaya, Spain. Phone: 946 012 816. Fax.: 946 012 781. e-mail: ocpgamoi@lg.ehu.es.

This study was funded by FIS Project no. 144.327-0364/99

García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Portugal V, Castro B, Caramés J, Méndez J. Effect of hepatic resection on development of liver metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 771-776.

INTRODUCTION

Ever since Higgins *et al.* (1) demonstrated over half a century ago the capacity of the liver to regenerate after partial hepatectomy and to quickly regain its initial mass, liver resection has been increasingly used as an alternative for managing localized metastatic disease and has opened up an important area for study in experimental surgery. Interest in this field of research has been further prompted by the recent isolation of substances responsible for liver regeneration (2,3). As might be expected, there is a specific hepatocyte growth factor (HGF), but there is also a range of other growth factors (GF) that are also involved in regulating hepatocyte proliferation, such as epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor alpha and beta (TGF-alpha, TGF-beta), and basic fibroblast growth factor (FGFb), among others (4,5).

While surgery may be considered one of the most effective therapies for treating liver metastasis, recurrence of the disease is a common phenomenon. Relapse normally occurs when the residual micrometastases present in the resected liver start to grow (6). There are at least two major biological processes involved in this metastatic development, both of which are also dependent on the presence of GF, namely cell proliferation and angiogenesis. Thanks to the existence on the plasma membrane surface of specific receptors for GF secreted by the neoplastic cells (autocrine GF) or by the cells of the host organ (paracrine GF), tumor cells receive the mitogenic signal they need to divide and proliferate, thus giving rise to an increase in the tumor mass (7-9). However, this would not

be possible without an adequate connective-vascular network supporting the accelerated proliferation. Such support can be induced either by the tumor cells or by the cells of the invaded organ, through secretion of neoangiogenic, or vascular endothelial, growth factors (VEGF) and fibroblast proliferation-stimulating GF (FGFb, among others (10).

In this two-way communication between tumor cells and liver cells (11), the GF responsible for hepatic regeneration, such as HGF, FGFb, EGF, VEGF, etc. are involved (12-14). This means that the growth factors secreted during partial hepatectomy prompt not only hepatocyte proliferation, but the growth of tumor cells as well. Given this premise, we need to investigate the effect that surgical management of localized metastasis may have on subsequent tumor growth.

Accordingly, we have studied the impact of partial resection of metastasized liver on the development of residual micrometastases and on the evolution of neoplastic disease as a whole, in order to attain an adequate model for testing therapeutic measures to counteract the influence of surgery.

MATERIAL AND METHODS

We used male, 8-week old WAG rats (150 ± 20 g), stabilized with a 12-h light/darkness cycle and given food and drink "ad libitum". Spain's National Guidelines for the care of laboratory animals (Royal Decree Law no. 223/88) were followed at all times. As a tumor model we used the rhabdomyosarcoma cell line (syngeneic for WAG rats) S4MH, with high affinity for the development of liver metastasis. The cells (2.5×10^6 cells, resuspended in 250 μ l of PBS) were administered by subcutaneous inoculation in the animals' right flank.

Following inoculation, the rats were randomly distributed into four groups of 20 animals: control, tumorectomy (with complete extirpation of the primary malignant lesion on day 23 post-inoculation), partial (40%) hepatectomy (excision of left lateral lobe on day 23 post-inoculation) and a group subjected to both procedures (tumorectomy and partial hepatectomy). To facilitate the recovery of animals following surgery, 5 ml of 5% serum glucosed i.p. was administered. Half of the animals of each group were sacrificed at two different times in the course of the experiment (day 25 or 35 post-inoculation, respectively), by severing the upper spinal cord under ether anesthesia. The existence and/or the number of metastases in different locations (groin, axilla, retroperitoneum, intraperitoneum, mediastinum, lung and liver) was recorded, as was the weight of the animal, of the liver and, where applicable, of the primary tumor. Finally, the regenerative capacity of the liver was studied by microspectrophotometry on histological sections of the paramedian lobe extracted from animals sacrificed on day 25 post-inoculation and prepared with Schiff stain (Feulgen reaction).

Statistical analysis was performed using Fisher's exact test to compare the frequency of appearance of glandular metastases, and applying Student's *t*-test for other quantitative parameters.

RESULTS

Effect of tumorectomy on the course of metastatic disease

Resection of the primary tumor was followed by a significant increase in the frequency of metastasis in axillary and inguinal glands. As shown in table I, while no glandular metastases were detected in the control group on day 25 post-inoculation, 70% of the animals that underwent tumorectomy exhibited ipsilateral axillary adenopathies ($p < 0.005$). On day 35 post-inoculation, this percentage had increased to 100%. Moreover, 90% of these animals also had ipsilateral inguinal adenopathies, compared to 10% of the animals in the control group ($p < 0.005$). On the other hand, however, no significant differences were found in the frequency of metastases in contralateral glands, intra- and retroperitoneum, mediastinum and lung (Table I). Similarly, no significant differences were found between the control group and the group that underwent tumorectomy, either in the number of metastatic colonies in the liver (5.2 vs 5.1 macroscopic sites; Table II), or in their distribution in the different hepatic lobes (Table III).

With regard to the percentage of regenerating hepatocytes, and taking as our reference normal baseline hepatic regeneration values ($2.5\% \pm 1.6$), tumorectomy did not significantly alter this figure ($1.7\% \pm 1.9$; Table IV). Finally, compared to the control group, resection of the primary tumor also caused no significant change in liver weight as a percentage of total animal weight (Table V).

Effect of partial hepatectomy on the course of metastatic disease

As was observed in the group of animals that had their primary tumor removed, partial hepatectomy gave rise to an increased rate of metastasis in inguinal and axillary glands. Moreover, this increase paralleled the rate changes detected in the tumorectomized group, regarding both the time of appearance of the inguinal and/or axillary metastases, and the percentage of animals exhibiting these lesions. On day 25 post-inoculation, 70% of the hepatectomized animals exhibited ipsilateral axillary adenopathies ($p < 0.005$), a figure which had risen to 100% by day 35 post-inoculation, when 90% of the animals also had ipsilateral inguinal adenopathies ($p < 0.005$). Moreover, there was also a rise in the frequency of contralateral axillary and inguinal gland metastases (40 and 50%, respectively), although this increase was not statistically

Table I. Evolution of metastasis

| Metastatic location | Control | | Tumorectomy | | Hepatectomy | | Tumorectomy+Hepatectomy | |
|---------------------|---------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------------------|--------|
| | Day 25 | Day 35 | Day 25 | Day 35 | Day 25 | Day 35 | Day 25 | Day 35 |
| Inguinal | | | | | | | | |
| ipsilateral | 0 | 10 | 0 | 90* | 0 | 90* | 0 | 90* |
| contralateral | 0 | 10 | 0 | 20 | 0 | 50 | 0 | 20 |
| Axillary | | | | | | | | |
| ipsilateral | 0 | 10 | 70* | 100** | 70* | 100** | 90** | 90* |
| contralateral | 0 | 10 | 0 | 20 | 0 | 40 | 0 | 40 |
| Retroperitoneal | 50 | 100 | 60 | 100 | 70 | 100 | 90 | 100 |
| Intraperitoneal | 0 | 50 | 0 | 60 | 0 | 60 | 0 | 90 |
| Mediastinal | 0 | 30 | 0 | 40 | 0 | 10 | 0 | |
| Pulmonary | 30 | 90 | 10 | 100 | 30 | 100 | 40 | 100 |

Figures express the percentage of animals in which macroscopic metastases were found in this location. Comparisons between each series and the control group were made using the Fisher test: *p < 0.005; **p < 0.0005.

Table II. Number of macroscopic hepatic metastases

| | A: all hepatic lobes | | | | B: left lateral lobe excluded | | | |
|--------------|----------------------|------|------|-------|-------------------------------|------|------|-------|
| | Average | SD | Mean | Range | Average | SD | Mean | Range |
| Control | | 5.17 | 5 | | | 2.32 | 3 | |
| Tumorectomía | | 4.26 | 5 | | | 2.55 | 3 | |
| Hepatectomía | | 1.57 | 1.5 | | | 1.57 | 1.5 | |
| Tum. + Hep. | | 6.38 | 8 | | | 6.38 | 8 | |

In table B metastases found in the left lateral lobe were eliminated to facilitate comparison with the series in which partial hepatectomy was performed. *Indicates p < 0.05 compared to control group.

Table III. Distribution of macroscopic metastasis per liver lobe

| | Distribution acc. to liver mass % | Median | Left lateral | Right lateral | Caudate |
|----------------|-----------------------------------|--------|--------------|---------------|------------|
| | | | | | |
| 30% | | | | | |
| Complete liver | Control | | | | |
| | % metastasis | | | | |
| | Tumorectomy | | | | |
| 50% | | | | | |
| Hepatectomy | Hepatectomy | | | | 47% |
| | % metastasis | | | | 0.7±0.21 |
| | Tum. + Hep. | | | | 21% |
| | | | | | 2.25±0.88 |

Figures in bold show the percentage of mass corresponding to each hepatic lobe. For each experimental group, the table shows the percentage of macroscopic metastasis colonizing each lobe, as well as the average number of macroscopic metastases (plus standard error).

significant ($p=0.15$; $p=0.07$). A further parallel with the tumorectomized group concerns the frequency of metastases in the remaining anatomical locations evaluated. In the hepatectomized group, there was no significant change compared to the control group.

Regarding the number of metastatic colonies in the liver compared to controls, we found that if the left lateral

lobe was excluded from the count (Table IIB), the number of liver metastases was lower in the hepatectomized animals, but that the difference compared to the control group was not significant (1.5 ± 1.6 vs 2.9 ± 2.3 ; $p = 0.08$). However, as can be seen from table III, the distribution of metastases among the different hepatic lobes did not depend on the percentage of liver mass in each, there being

a greater tropism for the caudate lobe in the hepatectomized animals compared to the control group (47 vs 14%, respectively; $p < 0.05$).

With regard to hepatic regenerative response, as was to be expected, 40% partial hepatectomy produced a significant rise in the percentage of regenerating hepatocytes compared to the control group (18.7 ± 5.5 vs 2.5 ± 1.6 ; Table IV). However, hepatectomy did not modify liver weight or primary tumor weight parameters (Table V).

Effect of combined treatment on the course of metastatic disease

The combined tumorectomy + partial hepatectomy treatment produced an intensification of the metastatic process compared to the groups that underwent tumorectomy or hepatectomy alone. Regarding glandular metastases, as occurred in the groups of animals subjected only to either tumorectomy or hepatectomy (Table I), there was an increase in the frequency of ipsilateral inguinal and axillary gland metastases. Moreover, with regard to the latter, on day 25 post-inoculation the percentage was even higher than in the other two experimental series (90 vs 70%). A similar increase was also detected in retroperitoneal and pulmonary metastases on day 25 post-inoculation, and in intraperitoneal and mediastinal metastases on day 35 post-inoculation, although in these cases the difference compared to controls was not statistically significant.

However, the liver was the organ where metastatic development was observed to be most intense following the combined tumorectomy + hepatectomy treatment (Table IIA). The differences are even greater if we exclude from the count metastases in the hepatectomized left lateral lobe: compared to the control group, in the series that was tumorectomized and hepatectomized, the number of metastases grew by 300% ($p < 0.05$; Table IIB). Moreover, compared to the exclusively hepatectomized group, there was a change in the lobular distribution of the metastases, with the right lateral lobe exhibiting the largest percentage of metastatic colonies (44%) instead of the cau-

Table IV. Percentage of regenerating hepatocytes in tumor-bearing animals and in non-inoculated controls

| | Tumor-bearing animals | Non-inoculated | |
|--------------------|-----------------------|----------------|------|
| Hepatectomy | | | |
| | 17.24 | 49.1 | 2.83 |
| | 21.87 | 47.1 | 4.8 |
| | 25.24 | 25.0 | 0.7 |
| | 16.19 | 34.1 | 1.17 |
| | 16.23 | 28.1 | 2.95 |
| | 8.57 | 54.1 | |
| | 18.82 | 12.1 | |
| | 25.45 | 31.1 | |
| | ----- | 12.1 | |
| Average | 18.70* | 33.0 | 2.49 |
| SD | 5.55 | 15.1 | 1.63 |

The differences are significant (*) compared to controls or (++) compared to the hepatectomized group, $p < 0.05$.

date lobe (20%; Table III). Parallel to the increase in metastatic load in the liver, this group of animals also exhibited a very significant rise in the percentage of regenerating hepatocytes, which almost doubled the rate detected in the exclusively hepatectomized group (33 vs 19%; $p < 0.05$). Finally, compared to the control group, there were no differences in the relative hepatic weight of the group subjected to the combined surgical treatment on either of the two post-inoculation days analyzed.

DISCUSSION

This study demonstrates the stimulatory effect of surgical treatment (i.e. tumorectomy and/or partial hepatectomy) on metastatic proliferation in cancer. Both resection of the primary tumor and resection of localized liver metastases have been shown to be clinically effective as curative or palliative treatments in managing neoplastic disease (15-17). However, during both types of surgery,

Table V. Clinical evolution parameters

| | Day 25 | | | | Day 35 | | | |
|-------------|--------------|-----------|----------------------|------------|--------------|-----------|----------------------|------------|
| | Liver weight | | Primary tumor weight | | Liver weight | | Primary tumor weight | |
| | Absolute | Relative | Absolute | Relative | Absolute | Relative | Absolute | Relative |
| Control | 9.2 ± 0.7 | 5.3 ± 0.5 | 15.5 ± 1.8 | 8.9 ± 0.9 | 7.3 ± 1.3 | 4.1 ± 0.6 | 25.5 ± 5.2 | 14.3 ± 2.5 |
| Tumorectomy | 7.1 ± 0.7 | 4.7 ± 0.4 | | 8.5 ± 1.3 | 5.1 ± 0.5 | | | |
| Hepatectomy | 7.9 ± 0.7 | 4.8 ± 0.3 | 17.9 ± 7.6 | 10.8 ± 4.1 | 8.5 ± 1.7 | 4.4 ± 0.8 | 27.4 ± 6.4 | 14.2 ± 2.7 |
| Tum. + Hep. | 6.4 ± 0.6 | 4.8 ± 0.4 | | 7.9 ± 2.2 | | | | |

The figures express the absolute weight in grams of the liver and the primary tumor, and the percentage they account for of total body weight (average ± SD). The differences observed were not statistically significant.

different soluble factors are released that may be involved not only in tissue inflammation and regeneration processes, but also in the proliferation of residual or subclinical metastatic disease. Today, it is well known that these soluble factors released by the host are essential for enabling tumor cells and metastases to grow, thanks to what is called the paracrine growth mechanism of metastatic disease (7-9).

The tumor-stimulating effect secondary to tumorectomy and hepatectomy was demonstrated thanks to the use of an experimental model having the advantage of exhibiting all the stages in the metastatic process (18). In this study, day 23 post-inoculation of tumor cells was chosen as the best time for performing the two types of surgical procedure, since according to our observations, in this model metastatic colonies can first be detected in the liver on day 25, a date which further coincides with the time of maximum hepatocyte regeneration following 40% partial hepatectomy. Day 35 was defined as the date of maximum metastatic load, since this marks the point in the experiment when all the animals have developed metastasis in the liver and there is still 90% survival. While day 23 is obviously too late in animal experimentation to undertake therapeutic measures designed to enhance subject survival (e.g. tumorectomy performed as curative surgery), it is nonetheless the best time for meeting the objectives of this work: to study the metastatic process and how it is affected by surgical intervention.

The study shows that when either of the surgical procedures (tumorectomy or hepatectomy) is performed individually, the outcome is an increase in glandular metastases, with no significant change in the number of metastases in lung or liver. However, when the two procedures are performed together as a combined treatment, the liver is the organ most clearly affected, with a significant increase in the number of metastases. This effect could be related to the demonstrated affinity of S4MH cells for metastasizing in the liver, a target organ that provides a good microenvironment for their development, which is further fostered by the release of growth factors following hepatectomy. Other authors have also shown that partial hepatectomy triggers tumor growth, suggesting a certain selectivity for the development of tumor cells present in the liver due to the release, following hepatic resection, of growth factors such as TGF α , TGF β , FGFb and HGF, which do not appear to stimulate the cells present, for example, at the pulmonary level (12). Of these factors, HGF is the one most clearly involved in the relation between liver regeneration and the metastatic process. Indeed, HGF has been shown to be a mitogenic factor for different types of tumor populations that express plasma membrane surface receptors for this factor (HGF-R) (13,19), stimulating their proliferation through mechanisms including activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3-kinase) (20).

Authors such as Jiang *et al.* have reported that certain tumor cells, in addition to expressing HGF-R, are capa-

ble of autocrine secretion of HGF (14). Moreover, it has also been suggested that tumor resection may even be followed by an overexpression of HGF-R in any residual tumor cells (21). Thus tumorectomy with concomitant hepatectomy, such as the treatment performed in our study, would give rise to the simultaneous co-existence of an increase in HGF-R expression in tumor cells and an increase in soluble HGF, thereby greatly stimulating metastatic growth. This was confirmed in our study, where we observed that, in the group that underwent both surgical procedures, the number of metastases increased nearly three-fold compared to the other experimental series. However, in the case of tumorectomy or hepatectomy performed in isolation, the autocrine or paracrine effect of normal cell-derived growth factors – fibroblasts, endothelial cells, macrophages or hepatocytes – could also provide sufficient stimulus to prompt quickened local-regional tumor growth, such as the development of glandular metastases, which has also been suggested by other authors (6,7).

Another noteworthy result of the present study was the anatomical distribution of the liver metastases, where preferential location in one of the hepatic lobes was observed. This finding would seem to support the opinion of authors who claim that resection of hepatic metastasis should be used as sparingly as possible. However, in view of the results outlined above and of work published previously where it is suggested that minimal hepatic resection leads to pronounced stimulation of residual tumor cell growth, whereas larger hepatectomy (60%) may actually suppress it (22-23), it would seem legitimate to question the claim that hepatic resection should be limited.

In conclusion, while surgical removal may represent the only curative alternative for primary tumors and hepatic metastases, it is necessary to take into account the indirect stimulatory effect that surgery may have on microscopic metastatic disease. Therefore, it is essential to develop new therapeutic approaches that will prevent or annul this tumor-stimulating effect in the surgical treatment of neoplastic disease.

REFERENCES

1. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202.
2. Fausto N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog Growth Factor Res* 1991; 3 (3): 219-34.
3. Francavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl TE. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Oncology* 1993 (Supl.): 1-7.
4. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
5. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, *et al.* Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 683-6.
6. Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 995-8.

7. Nicolson GL. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumour metastases to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993; 12: 325-43.
8. Menter DG, Herrmann JL, Nicolson GL. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastases. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13: 67-88.
9. Radinsky R. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 1993; 12: 345-61.
10. Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, Benoy I, Martin M, De Pooter O, et al. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 843-8.
11. Okamoto H, Ohigashi H, Nakamori S, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai L, et al. Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells. Involvement of endothelial cell migration and tumor cell proliferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res* 2000; 32: 374-9.
12. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 1998; 124: 57-64.
13. Von Schweinitz D, Faundez A, Teichmann B, Birnbaum T, Koch A, Hecker H, et al. Hepatocyte growth-factor-scatter factor can stimulate post-operative tumor-cell proliferation in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* 2000; 85: 151-9.
14. Jiang WG, Hallett MB, Puntis MCA. Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastases. *Br J Surg* 1993; 80: 1368-73.
15. Suzuki S, Sakaguchi T, Yokoi Y, Kurachi K, Okamoto K, Okamura T, et al. Impact of repeat hepatectomy on recurrent colorectal liver metastases. *Surgery* 2001; 129(4): 421-8.
16. Doko M, Zovak M, Ledinsky M, Mijic A, Peric M, Kopljar M, et al. Safety of simultaneous resections of colo-rectal cancer and liver metastases. *Coll Antropol* 2000; 24 (2): 381-90.
17. Fujii K, Fujioka S, Kato K, Machiki Y, Kutsuna Y, Ishikawa A, et al. Factors influencing survival in 33 patients undergoing resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47 (33): 607-11.
18. Alonso-Varona A, García-Alonso I, Portugal V, San Emeterio E, et al. Desarrollo de un modelo experimental para el estudio de metástasis hepáticas. *Rev Esp Enferm Dig* 1994; 86 (1): 521-25.
19. Hamoen KE, Borel IHM, Morgan JR. Hepatocyte growth factor and melanoma: gene transfer studies in human melanocytes. *Melanoma Res* 2001; 11: 89-97.
20. Cho MK, Kim SG. Hepatocyte growth factor activates CCAAT enhancer binding protein and cell replication via PI3-kinase pathway. *Hepatology* 2003; 37: 686-95.
21. Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kanai T, Umeshita K, Mori T, et al. Hepatocyte growth factor concentrations after liver resection. *Lancet* 1992; 339: 818.
22. Yokoyama H, Goto S, Chen CL, Pan TL, Kawano K, Kitano S. Major hepatic resection may suppress the growth of tumours remaining in the residual liver. *Br J Cancer* 2000; 83 (8): 1096-101.
23. Rashidi B, An Z, Sun FX, Sassón A, Gamagami R, Moossa AR, et al. Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 497-500.