

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



CONTROL METABÓLICO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA  
ASOCIADA A LA REALIZACIÓN DE LIGADURA PORTAL Y  
PARTICIÓN DE PARÉNQUIMA HEPÁTICO (ALPPS):  
ACTIVACIÓN DE LA VÍA AMPK/mTOR

CARLOS JESÚS MANDIOLA BUNSTER

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS MÉDICAS

Director Básico de Tesis: Prof. Pamela Romanque U.  
Director Clínico de Tesis: Prof. Sebastián Uribe-Echevarría A.

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,  
que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

**CARLOS JESÚS MANDIOLA BUNSTER**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar  
al Grado de Doctor en Ciencias Médicas en Examen de Defensa de Tesis rendido  
el día 11 de Mayo de 2017.

**Prof. Pamela Romanque U.**

Director Básico de Tesis  
Programa de Fisiopatología  
Unidad de Patología Hepática  
Experimental  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina, U. de Chile

**Prof. Sebastián Uribe-Echevarría A.**

Director Clínico de Tesis  
Departamento de Cirugía  
Hospital del Salvador  
Facultad de Medicina, U. de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Mario Uribe M.

Prof. Nicolás Jarufe C.

Prof. Marcelo E. Ezquer

Prof. Mariana Rojas R.  
Presidenta Comisión de Examen

DEDICATORIA

*Con infinito amor  
A mi papá y a mi mamá*

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera sinceramente expresar mi gratitud a quienes han sido parte del desarrollo de este proyecto:*

*A la Prof. Pamela Romanque, por darme la confianza y el espacio de plena libertad para proponer y desarrollar mis ideas en el transcurso de este trabajo. Por sus asertivas observaciones y comentarios con el genuino ánimo de mejorarlo.*

*A los Profesores Mario Uribe y Sebastián Uribe-Echevarría, por la generosidad demostrada al permitirme entrar a la intimidad de su equipo de trabajo y compartir a sus pacientes en la consecución de los objetivos planteados en mi tesis. A través de ellos, hago extensivo mi agradecimiento al Departamento de Cirugía del Hospital del Salvador y a sus funcionarios, por la acogida y buena recepción durante mi permanencia en dicho establecimiento.*

*A María Ignacia Zapata, por su compromiso para el correcto desarrollo de las distintas fases experimentales, por enseñarme el día a día de la ciencia.*

*A Romina Vargas, por su permanente y sincera ayuda, por estar siempre presente, por su invaluable amistad.*

*Al Prof. Luis Videla y a la Prof. Virginia Fernández, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme un espacio de trabajo para completar mis objetivos, por su atenta preocupación.*

*A la Prof. Gladys Tapia, por su ayuda y asistencia técnica en los momentos que lo requerí.*

*A la Sra. Rosa, por su cotidiana calidez y atenta disposición.*

*Al Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, por entregarme las herramientas y el conocimiento básico necesario para desarrollar parte fundamental de mi proyecto, por otorgarme las facilidades desde un principio para el*

*desarrollo de mi tesis; y a su equipo de cirugía Digestiva Hepatobiliopancreático y Trasplantes, por la paciencia en la espera a mi regreso.*

*A mi mamá Kattia, por su entrega absoluta, por su compañía permanente, por sus constantes expresiones de cariño, por ser como es.*

*A mi papá Carlos, por ser mi ejemplo, por su inconmensurable sabiduría, por tener las palabras precisas cuando las necesito, por amarme tanto.*

*A mis hermanas Kattia, María Paz y Fernanda, por su ayuda desde siempre.*

*A Débora, por acompañarme y entenderme incondicionalmente en este proceso.*

*A todos quienes sin querer he olvidado agradecer...*

*Muchas gracias*

Esta tesis fue financiada por:

Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Proyecto FONDECYT REGULAR N°1130274.

Concurso de Proyectos de Investigación SAVAL 2015 de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Programa Formación de Capital Humano Avanzado CONICYT, Concurso Becas para Estudiantes de Doctorado en Chile.

*“...progress consists of a series of great and small revolutions against authority. A great advance necessitates the overthrow of an established dogma, and when that occurs the advance itself becomes the new dogma...”*

T.E. Starzl, 1975

## ÍNDICE GENERAL

Contenidos	Página
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice general	VII
Índice de figuras	X
Índice de tablas	XII
Abreviaturas	XIII
Resumen	XVI
<i>Abstract</i>	XVIII
I. Introducción	1
1.1 Principios de una hepatectomía segura e insuficiencia hepática post operatoria	4
1.2 Estrategias quirúrgicas para disminuir el riesgo de insuficiencia hepática post operatoria	5
1.3 ALPPS: <i>Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy</i>	9
1.4 Mecanismos de regeneración hepática	18
1.5 Estímulos asociados a regeneración hepática, rol del <i>shear stress</i>	20
1.6 Respuesta metabólica asociada a regeneración hepática: rol de AMPK/mTOR	23
II. Hipótesis	31
III. Objetivo general	31
IV. Objetivos específicos	31
V. Materiales y métodos	34
5.1 Estudios en animales	34
1. Diseño experimental y protocolo de estudio quirúrgico	34
2. Medición de ganancia volumétrica del remanente hepático	39
3. Análisis de función hepática	39
4. Análisis histopatológico e inmunohistoquímica	40



5. Marcadores de proliferación celular	40
6. Marcadores serológicos	40
7. Análisis de ácidos grasos hepatocelular	41
8. Estudios de reacción de polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	41
9. Western blot	42
10. Análisis estadísticos	43
5.2 Estudios en humanos	44
1. Tipo, población y lugar de estudio	44
2. Criterios de inclusión y de exclusión	44
3. Técnica quirúrgica de ALPPS y protocolo de estudio	46
4. Medición de ganancia volumétrica del remanente hepático	49
5. Análisis de laboratorio clínico y función hepática	49
6. Análisis histopatológico e inmunohistoquímica	50
7. Marcadores serológicos	50
8. Estudios de reacción de polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	50
9. Descripción clínica y demográfica de pacientes	51
10. Morbilidad y mortalidad post ALPPS	51
11. Análisis estadísticos	52
VI. Resultados	54
6.1 Estudios en modelo animal de ALPPS	54
1. Estandarización de modelo de ALPPS e incremento volumétrico de remanente hepático	54
2. Evaluación de parámetros de función hepática	56
3. Cambios histológicos y marcadores de proliferación celular	58
4. Evaluación de marcadores de inflamación y progresión en regeneración hepática	63
5. Evaluación del estado metabólico sistémico y hepatocelular	67
6. Activación de la vía de señalización mTOR	71
7. Efectos de rapamicina sobre la vía de señalización de mTOR	76

y ganancia de masa hepática	
6.2 Estudios en pacientes sometidos a ALPPS	78
1. Caracterización clínica de pacientes sometidos a ALPPS	78
2. Cambios biométricos del tejido hepático remanente	80
3. Función hepática post operatoria e insuficiencia hepática post operatoria	81
4. Resultados clínicos de pacientes sometidos a ALPPS y sobrevida	83
5. Cambios histológicos y marcadores de proliferación celular	85
6. Parámetros de inflamación y progresión en regeneración hepática	88
7. Activación de la vía de señalización de mTOR	91
VII. Discusión	94
VIII. Reflexiones finales y perspectivas futuras	116
IX. Conclusión	129
X. Bibliografía	130
XI. Anexo	159
Anexo 1. Formulario de información y consentimiento informado escrito, aprobación por comité de ética	140
Anexo 2. Publicaciones y presentaciones a congresos generadas de este trabajo	143

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenidos	Página
Figura 1. Técnica de ALPPS para hepatectomía derecha extendida	11
Figura 2. Vía de señalización y regulación de mTOR en células animales	27
Figura 3. Esquema de anatomía topográfica de hígado de rata y de modelo microquirúrgico experimental de ALPPS	35
Figura 4. Modelo microquirúrgico experimental de ALPPS en hígado de rata	36
Figura 5. Diseño experimental y grupos de estudio de animales de acuerdo a protocolo operatorio	38
Figura 6. Maniobra del estudio clínico de pacientes candidatos a tratamiento quirúrgico mediante protocolo ALPPS	46
Figura 7. Protocolo de estudio clínico de pacientes sometidos a ALPPS	48
Figura 8. Cambios de la relación entre peso de remanente y peso corporal total (PR/PT) en el tiempo	55
Figura 9. Pruebas de función y/o daño hepatocelular en el tiempo tras las intervenciones quirúrgicas en ratas	57
Figura 10. Estructura tisular de muestras histológicas de tejido hepático remanente de ratas	59
Figura 11. Índice mitótico en muestras histológicas de tejido hepático remanente de ratas	60
Figura 12. Hepatocitos Ki-67 positivos en muestras de tejido hepático remanente de ratas	62
Figura 13. Marcadores de inflamación y progresión en regeneración hepática en ratas	64
Figura 14. Infiltrado inflamatorio por células mieloperoxidasa positivo en tejido hepático remanente de ratas	66
Figura 15. Estado metabólico sistémico en ratas	67
Figura 16. Evaluación de contenido de glucógeno tisular en tejido hepático remanente de ratas	69
Figura 17. Estado metabólico hepatocelular en ratas	70
Figura 18. Expresión de genes relacionados a la vía de señalización de mTOR	73

en muestras de tejido hepático remanente de ratas	
Figura 19. Efectos de rapamicina en la expresión génica y activación proteica de mTOR en tejido hepático remanente de ratas	75
Figura 20. Efectos de rapamicina en incremento de masa hepática post ALPPS en ratas	77
Figura 21. Cambios biométricos del tejido hepático remanente de pacientes sometidos a ALPPS	81
Figura 22. Pruebas de función y/o daño hepatocelular perioperatorios en pacientes sometidos a ALPPS	82
Figura 23. Principales resultados post operatorios de pacientes tratados mediante técnica de ALPPS y curva de sobrevida	85
Figura 24. Estructura tisular de muestras de tejido hepático deportalizado ( <i>Right lobe</i> ) y de tejido hepático remanente ( <i>Left lobe</i> ) previo a primer y segundo tiempo operatorio de pacientes sometidos a ALPPS	86
Figura 25. Parámetros de proliferación celular en muestras de tejido hepático deportalizado y remanente previo a primera y segunda etapa operatoria de pacientes sometidos a ALPPS	88
Figura 26. Niveles serológicos de marcadores de inflamación y progresión en regeneración hepática previo a primer y segundo tiempo operatorio de pacientes sometidos a ALPPS	89
Figura 27. Expresión de genes asociados a inflamación y progresión en regeneración hepática previo a primera y segunda etapa de ALPPS	90
Figura 28. Expresión de genes relacionados a la vía de señalización de mTOR previo a primera y segunda etapa de ALPPS	92
Figura 29. Modelo propuesto de regeneración hepática en ALPPS	114

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenidos	Página
Tabla 1. Partidores específicos de genes de ratas (Rn) y humanos (Hs) para ensayos de qRT-PCR	42
Tabla 2. Características clínicas de pacientes sometidos a ALPPS	78
Tabla 3. Variables quirúrgicas de pacientes sometidos a ALPPS	79
Tabla 4. Complicaciones de acuerdo a la clasificación de Clavien Dindo de morbilidad quirúrgica	84

## ABREVIATURAS

ALPPS: Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy

AMPK: 5´AMP-activated protein kinase

AST/GOT: Aspartato aminotransferasa/transaminasa glutámico oxalacética

ALT/GPT: Alanina aminotransferasa/transaminasa glutámico pirúvica

AMP/ATP: Adenosine monophosphate/Adenosine triphosphate

C: Celsius

cm: Centímetros

CMA: Campos de mayor aumento

Col: Colaboradores

cDNA: Complementary Deoxyribonucleic acid

dL: decilitros

DNA: Deoxyribonucleic acid

DE: Desviación estándar

EGF: Epidermal growth factor

ErbB/HER: Epidermal growth factor receptor family

g: Gramos

G: Fuerza centrífuga relativa

GR: Glóbulos rojos

GTP: Guanosine triphosphate

HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor

HE: Hematoxilina-eosina

HGF: Hepatocyte growth factor

HGFR/c-met: Hepatocyte growth factor receptor

Hrs: Horas

Hs: genes de humanos

HuR: Human antigen R

IGF-1/IGF1-R: Insulin-like growth factor 1/Insulin-like growth factor 1 receptor

IL-1/IL-6: Interleukin-1/Interleukin-6

INR: International normalized ratio

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule

IRS-1: Insulin receptor substrate 1

kg: Kilogramos

LC: Lóbulo hepático caudado de rata

LD: Lóbulo hepático derecho de rata

LI: Lóbulo hepático izquierdo de rata

LM: Lóbulo hepático medio de rata

LL: Left human lobe

LP: Ligadura portal

M: Molar

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MELD: Model for End-stage Liver Disease

mg: Miligramos

min: Minutos

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

mTOR: mammalian Target of Rapamycin

mTORC1/mTORC2: mammalian Target of Rapamycin Complex 1/2

mRNA: messenger Ribonucleic acid

mLST8: mammalian Lethal with SEC13 protein 8

NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

nm: Nanómetros

NOS: Nitric oxide synthase

PAS: Periodic acid–Schiff

PDGF-R: Platelet-derived growth factor receptor

PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

PI-4,5-P2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PI-3,4,5,-P3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PO: Post operative/post operatorio

PR/PH: Relación entre el peso del remanente y el peso total de hígado en la rata

PR/PT: Relación entre el peso del remanente y el peso corporal total de la rata y/o humanos

PKC: Protein kinase C

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

PVL: Portal vein ligation

qRT-PCR: Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Raptor: Regulatory-associated protein of mTOR

Rheb: Ras homolog enriched in brain

RL: Right human lobe

Rn: genes de ratas

R0: resección quirúrgica oncológica sin lesión tumoral residual

R1: resección quirúrgica oncológica con lesión tumoral residual microscópica

R2: resección quirúrgica oncológica con lesión tumoral residual macroscópica

Rx: resección quirúrgica oncológica con lesión tumoral residual no evaluable

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

S6K1: Ribosomal protein S6 kinase beta-1/ p70S6 kinase

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$

TGF- $\alpha/\beta$ : Transforming growth factor  $\alpha/\beta$

TSC1/TSC2: Tuberous sclerosis complex 1/2

u-PA: Urokinase-type plasminogen activator

U/L: Actividad catalítica (katal) por litro

UI: Unidades internacionales

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR-1/2: Vascular endothelial growth factor receptor 1/2

VHR: volumen de tejido hepático remanente

4E-BP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

$\mu$ g: Microgramos

$\mu$ L: Microlitros

$\mu$ M: Micromolar

$\rho$ g: Picogramos



## Resumen

**Introducción:** *Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy –ALPPS-* es una técnica que combina la ligadura portal con la partición del parénquima, aumentando el volumen del remanente hepático previo a la resección. Los mecanismos biológicos implicados en tal respuesta regenerativa son desconocidos, aunque podrían estar asociados a la modulación de la actividad de AMPK/mTOR. El objetivo de este estudio fue determinar los mecanismos implicados en la ganancia de masa hepática post ALPPS en un modelo experimental animal y en pacientes, incluyendo el estudio de señales metabólicas y la participación de la vía AMPK/mTOR.

**Materiales y métodos:** Ratas Sprague Dawley (200-230 g) se asignaron a 4 grupos: modelo de ALPPS, ligadura portal (LP), partición hepática y *sham*. Se cuantificó la tasa de regeneración hepática, niveles séricos de marcadores de regeneración hepática, indicadores inmunohistoquímicos de proliferación hepatocelular (Ki-67) y parámetros de función hepática a 1, 3 y 7 días post cirugía. Se evaluó la expresión y activación de moléculas que participan en la vía de mTOR mediante qRT-PCR y los efectos de rapamicina, su inhibidor selectivo. A su vez, se estudió un grupo de pacientes sometidos a ALPPS referidos al Hospital del Salvador entre los años 2013 al 2015. En una primera etapa, la rama portal derecha fue ligada y el hígado transectado en el límite de los segmentos II-III; seguido de segundo tiempo resectivo. Los cambios de volumen del tejido hepático remanente (VHR) se analizaron mediante imágenes tomográficas con software OsiriX®. En ambos tiempos operatorios, se obtuvo muestras de suero, así como de tejido hepático deportalizado y del remanente, efectuándose análisis inmunohistoquímicos (Ki-67) y de expresión de la vía mTOR mediante qRT-PCR. Se analizó morbilidad perioperatoria y sobrevida asociada a ALPPS.

**Resultados:** Las ratas sometidas a ALPPS presentaron una ganancia de masa del remanente hepático significativamente mayor versus controles a 24 y 72 hrs, alcanzando igual masa que el grupo LP al 7° día, lo que estuvo asociado a un aumento significativo de núcleos Ki-67 (+) ( $p < 0,05$ ). La función hepática se conservó en ratas ALPPS, observándose un incremento transitorio de GOT-GPT a las 24

hrs, sin diferencias respecto al grupo LP ( $p > 0,05$ ). Los niveles de IL-6 sérica aumentaron en ALPPS versus todos los grupos controles ( $p < 0,05$ ). En grupos ALPPS y LP aumentaron los niveles de mRNA de mTOR ( $p < 0,05$ ), siendo la respuesta regenerativa de ratas ALPPS suprimida significativamente con rapamicina ( $p < 0,01$ ). Se incluyeron  $n=11$  pacientes sometidos a ALPPS, edad media  $58,8 \pm 8$  años. El VHR aumentó un  $111,6 \pm 63,47\%$  ( $p < 0,05$ ) en  $9,1 \pm 1,59$  días, con un aumento de  $34,43 \pm 17,27$  mL/día. La tinción nuclear Ki-67 (+) fue significativamente mayor en hepatocitos del remanente hepático en la segunda etapa versus la primera ( $p < 0,05$ ), sin diferencias entre muestras de lóbulos deportalizados. Entre la 1° y la 2° etapas de ALPPS hubo un aumento significativo de marcadores serológicos de regeneración hepática IL-6, TNF- $\alpha$ , HGF y EGF ( $p < 0,05$ ). Los niveles de mRNA de mTOR, S6K1 y 4E-BP1 aumentaron en el remanente hepático tras ALPPS ( $p < 0,05$ ), mientras que los niveles de mRNA de AMPK no se modificaron significativamente ( $p = 0,26$ ). No hubo cambios significativos en los lóbulos deportalizados. El 100% de los casos completó el segundo tiempo resectivo, presentándose complicaciones  $\geq$ IIIB en el 36,3% (4/11) de los pacientes. No hubo mortalidad a 90 días de las intervenciones.

Conclusión: ALPPS induce un aumento significativo de la masa del remanente hepático en un tiempo menor respecto a animales sometidos a ligadura portal y controles; y a técnicas clásicas de ligadura portal efectuada en pacientes, sin presentar un deterioro en la función hepática global. Este aumento en el volumen del remanente hepático tras ALPPS está asociado a un incremento de mediadores de progresión en regeneración hepática y de proliferación celular, lo que implica un incremento de masa hepatocelular funcional. Un mecanismo involucrado en esta respuesta corresponde a la activación de la vía AMPK/mTOR, que participa en la regulación de procesos celulares asociados a biosíntesis de macromoléculas y crecimiento celular.

*Abstract*

*Introduction: Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy -ALPPS- is a technique that combines portal ligation with parenchymal partition, increasing the liver remnant volume prior to resection. The biological mechanisms involved in this regenerative response are unknown, although they could be associated with the modulation of AMPK/mTOR activity. The aim of this study was to determine the mechanisms involved in hepatic mass increase triggered by ALPPS in an in-vivo experimental model and in patients, including the study of metabolic signals and AMPK/mTOR pathway role.*

*Materials and methods: Sprague Dawley rats (200-230 g) were assigned to 4 groups: ALPPS model, portal vein ligation (PVL), hepatic partition and sham. The liver regeneration rate, serum levels of hepatic regeneration markers, immunohistochemical indicators of hepatocellular proliferation (Ki-67) and hepatic function parameters at 1, 3 and 7 days after surgery were quantified. The expression and activation of molecules involved in the mTOR pathway was assessed by qRT-PCR and WB; and the rapamycin effects, a selective mTOR inhibitor, were analyzed. In turn, a prospective study of patients undergoing ALPPS referred to Hospital del Salvador between 2013 and 2015 was studied. In a first stage, the right portal branch was ligated and liver transected at the limit of segments II-III; followed by second resective time. The volume changes of remnant liver tissue were analyzed by CT-scan using OsiriX® software. In both operative times, serum samples were obtained, as well as of remnant and deportalized liver tissue, performing immunohistochemical analysis (Ki-67) and expression studies of mTOR pathway using qRT-PCR. It was analyzed perioperative morbidity and survival associated with ALPPS.*

*Results: The rats submitted to ALPPS showed a significantly higher liver remnant mass increase versus controls at 24 and 72 hrs, reaching the same mass as the PVL group on the 7th day, which was associated with a significant increase in Ki-67 (+) nuclei ( $p < 0.05$ ). Liver function was preserved in ALPPS rats, although there was transaminases transient increase at 24 hrs, without differences compared with PVL group ( $p > 0.05$ ). Serum IL-6 levels increased in ALPPS versus all control groups ( $p < 0.05$ ). In ALPPS and PVL groups increased mTOR mRNA levels ( $p < 0.05$ ), and the regenerative response of ALPPS rats was significantly suppressed with rapamycin ( $p < 0.01$ ). 11 patients undergoing ALPPS, mean age  $58.8 \pm 8$  years, were enrolled. Remnant liver volume increased  $111.6 \pm 63.47\%$  ( $p < 0.05$ ) in  $9.1 \pm 1.59$  days, equivalent to  $34.43 \pm 17.27$  mL/day. Ki-67 nuclear staining was significantly higher in hepatocytes of remnant liver tissue at second stage versus the first ( $p < 0.05$ ), with no differences between samples of deportalized lobes. Between 1st and 2nd stages of ALPPS there*

*was a significant increase in liver regeneration serum markers IL-6, TNF- $\alpha$ , HGF and EGF ( $p < 0.05$ ). The mRNA levels of mTOR, S6K1 and 4E-BP1 increased in liver remnant tissue after ALPPS ( $p < 0.05$ ), while AMPK mRNA levels were not significantly modified ( $p = 0.26$ ). There were no significant changes in deportalized lobes. All cases completed the second resective stage, and complications  $\geq$  IIB were present at 36.3% (4/11) of patients. There was no 90-day mortality after ALPPS.*

*Conclusion: ALPPS induces a significant increase of liver remnant mass in a shorter time compared to animals subjected to portal vein ligation and controls; and to classic techniques of portal vein ligation performed on patients, without impairs overall liver function. The remnant liver volume increment triggered by ALPPS is associated with an increase of liver regeneration and cell proliferation markers, which implies an increase in functional hepatocellular mass. A mechanism involved in this response is the activation of the AMPK/mTOR pathway, which regulates cellular processes associated with biosynthesis of macromolecules and cell growth.*

## **I. Introducción**

Las lesiones hepáticas tumorales malignas más frecuentes corresponden a metástasis de tumores primarios no hepáticos, encontrándose estas lesiones en el 40% de todos los pacientes que mueren por cáncer [1]. Sus orígenes se ubican en diversos órganos, siendo el hígado la segunda localización más frecuente de las neoplasias malignas después del sistema linfonodal [2].

Todas estas lesiones hepáticas son consideradas dentro de una enfermedad oncológica en etapas avanzadas, siendo la mayoría diagnosticadas cuando el tumor primario es conocido, aun cuando, es posible su presentación como enfermedad metastásica hepática con primario desconocido [2], teniendo éstas según su etiología, distinto pronóstico y respuesta al tratamiento [3-5]. Así, las metástasis hepáticas se clasifican, en base a su incidencia, pronóstico y evolución, en metástasis colorrectales, neuroendocrinas y no-colorrectales no-neuroendocrinas, siendo el primer grupo uno de los más frecuentes y el de mejor resultado pronóstico tras su tratamiento resectivo [2, 3].

A nivel mundial el cáncer colorrectal es el tercero con más alta incidencia, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer con 693.000 muertes y 1.360.000 nuevos casos diagnosticados al año [6]. En Chile, se estima que entre 1983-2008 ocurrieron 26.250 muertes por cáncer colorrectal, cuya tasa de mortalidad se ha duplicado durante este periodo a pesar de los avances en su manejo [7]. En este sentido, un 15-20% de los pacientes con cáncer colorrectal presentan metástasis hepáticas sincrónicas –al diagnóstico- y un 25-40% presentarán metástasis metacrónicas durante el seguimiento [8], lo que se relaciona al estadio del tumor primario [2].

La amplia predilección de las metástasis de cáncer colorrectal por el parénquima hepático, el cual constituye el primer sitio de recidiva tumoral en el 30% de los casos [2], se ha atribuido a sus vías de diseminación tanto linfática como venosa portal [9, 10], demostrándose a nivel experimental una significativa y temprana presencia de células tumorales de cáncer colorrectal en tejido hepático antes que en otras localizaciones [11], por lo que se ha sugerido que el hígado representaría una estación de localización metastásica en cáncer colorrectal precoz, actuando como filtro e incluso previniendo la diseminación tumoral a otros órganos a distancia [11].

Estudios que han evaluado la historia natural de la enfermedad han demostrado que pacientes con cáncer colorrectal y metástasis hepáticas sincrónicas, sin tratamiento tienen una media de sobrevida de 5-10 meses, siendo excepcional la sobrevida a 3 años [12]. La quimioterapia combinada como 5-fluorouracilo con irinotecan u oxaliplatino, junto a anticuerpos como bevacizumab o cetuximab, muestra tasas de respuesta >50% con media de sobrevida de 20 meses en pacientes con enfermedad avanzada, sin embargo, es infrecuente conseguir una respuesta terapéutica completa y sobrevida a 5 años sólo con quimioterapia [13].

Es así, como el tratamiento quirúrgico resectivo completo (R0) de las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal, representa la única opción de tratamiento con potencial curativo, con tasas de sobrevida a 5 años entre 25-58% mientras que a 10 años alcanza 9-26% [2, 3, 8, 14-17], siendo la media de sobrevida de estos casos mayor a 40 meses [3]. Tales hallazgos han sugerido que el compromiso hepático del cáncer colorrectal sea considerado una enfermedad locorregionalmente avanzada y no necesariamente sistémica, donde la cirugía constituye un pilar fundamental dentro de los principios terapéuticos, que incluyen otras

alternativas como la inyección de quimioterapia intraarterial, alcoholización, crioablación y ablación por radiofrecuencia de lesiones hepáticas [2, 3], ya sea con fines paliativos, curativos o para inducción de regresión de lesiones metastásicas –“*downstaging*”-, lo que se conoce como terapia multimodal. En este sentido, se debe considerar que las resecciones quirúrgicas hepáticas carecen de valor terapéutico cuando se ofrecen con fines paliativos [2].

En grandes series de pacientes sometidos a resección hepática por metástasis colorrectal se han identificado factores pronósticos post resección [14]. Así, aun cuando la edad, el compromiso extrahepático y la afectación hepática bilobular no necesariamente contraindican la cirugía, son factores asociados a peor pronóstico, debiendo ésta ser efectuada en casos seleccionados dentro de una terapia multimodal [18]. A su vez, el estado de márgenes quirúrgicos libres de tumor es de regla, obteniéndose con mayor seguridad en resecciones hepáticas anatómicas versus resecciones en cuña o simples –que presentan mayor proporción de márgenes quirúrgicos positivos- lo que impacta en las tasas de recidiva y sobrevida [19]. Sin embargo, a pesar de la utilidad clínica del tratamiento quirúrgico de las lesiones hepáticas, sólo un 15% de estos pacientes son susceptibles de este manejo, siendo el 85% restante considerados irresecables [20], ya sea por enfermedad tumoral extrahepática, número, tamaño y localización de las metástasis hepáticas y/o por el bajo volumen de tejido hepático remanente post resección, lo que implica un alto riesgo de insuficiencia hepática post operatoria [20].

En este contexto, si bien las hepatectomías anatómicas siguiendo los pedículos vasculares y los principios anatómicos de segmentación del parénquima hepático [21, 22], disminuyen los riesgos de recidiva tumoral al asegurar márgenes quirúrgicos libres, su realización requiere de la conservación de una cantidad mínima de tejido que permita sostener

las funciones biológicas del órgano en relación a las demandas fisiológicas, es decir, se requiere un volumen de remanente hepático futuro suficiente que permita la realización de una hepatectomía en forma segura.

### **1.1 Principios de una hepatectomía segura e insuficiencia hepática post operatoria**

Los principios quirúrgicos de una hepatectomía implican la preservación de al menos 2 segmentos hepáticos adyacentes con adecuado flujo sanguíneo de entrada –arterial y portal- y de salida –venoso-, junto a la indemnidad del drenaje del flujo biliar [23], a lo que se agrega la conservación de un volumen de remanente hepático futuro suficiente post resección, que se logra si se mantiene al menos 20% de hígado sano, un 30% de hígado si ha sido sometido a quimioterapia, y al menos el 40% (idealmente entre 50-70%) de parénquima en pacientes con hígado cirrótico en etapa Child A y sin hipertensión portal [23]. De esta manera, el principal factor limitante de una hepatectomía guarda estrecha relación con el grado de reserva funcional del hígado, que a su vez tiene directa correlación con la cantidad de parénquima conservado, en este sentido, ajustado a las necesidades fisiológicas del individuo, es que se ha sugerido la relación entre el remanente hepático futuro y el peso corporal total ( $\geq 0,5\%$ ) como un índice de suficiencia que predice adecuadamente el riesgo de insuficiencia hepática post operatoria [24].

Un problema de las hepatectomías ampliadas, es decir, aquellas en que se efectúa la resección de 3 o más segmentos, es la insuficiencia hepática post operatoria. Un estudio que evaluó más de 300 hepatectomías derechas extendidas determinó que aquellos pacientes con remanentes hepáticos post resección  $<30\%$ , presentaron una significativa incidencia de insuficiencia hepática post operatoria, la que alcanzó hasta un 34% cuando el remanente



hepático fue <20%, lo que se asoció a un 11% de mortalidad atribuible sólo a esta complicación [25].

La insuficiencia hepática post operatoria definida como el deterioro post operatorio adquirido –en pacientes con función hepática previa normal o anormal- de la funciones de síntesis, excretoras y de detoxificación de sustancias, representa una condición de alto riesgo con significativa morbimortalidad [26]. Clínicamente, se caracteriza por un incremento del INR –*international normalized ratio*-, disminución del tiempo de protrombina e hiperbilirrubinemia al quinto día post operatorio, objetivándose que aquellos pacientes con INR >1,7; tiempo de protrombina <50% y bilirrubina sérica total >3 mg/dL (>50 µmol/L) presentan un riesgo de mortalidad de 59% al quinto día post operatorio, aumentando a un 63% cuando tales alteraciones se pesquisan al séptimo día de la cirugía, así tales variables conocidas como “criterios 50-50”, son ampliamente empleadas para diagnosticar esta complicación debido a su importante valor pronóstico [27].

## **1.2 Estrategias quirúrgicas para disminuir el riesgo de insuficiencia hepática post operatoria**

Las primeras observaciones al respecto fueron realizadas por Rous y colaboradores quienes en 1920 establecen en un modelo de conejo, que la oclusión del flujo de una de las ramas de la vena porta resulta en atrofia del parénquima tributario ipsilateral e hipertrofia de los segmentos contralaterales [28], mientras que posteriormente, Higgins y su equipo en 1931 describen en un modelo de ratas, la capacidad de regeneración hepática tras la resección del 70% del parénquima [29, 30]. Tales hallazgos no tuvieron mayor trascendencia clínica, restringiéndose el uso clínico de ligadura portal en pacientes sometidos a hepatectomías para lograr el control de sangrado y la visualización del campo operatorio [31].

No fue sino hasta la década de 1980 cuando Makuuchi y colaboradores en forma contemporánea a Kinoshita y su equipo, introdujeron el uso clínico de la embolización portal, induciendo atrofia de los segmentos de la rama portal embolizada e hipertrofia del remanente hepático en series de pacientes con colangiocarcinoma, sometidos posteriormente a resección quirúrgica del lóbulo comprometido [32, 33]. Hacia el año 2000, Adam y colaboradores publicaron la técnica de hepatectomía en dos tiempos para pacientes con metástasis hepáticas bilobulares, donde en un primer tiempo quirúrgico se realiza la resección del lóbulo con mayor carga tumoral, para en un segundo tiempo operatorio completar la resección de las metástasis presentes en el remanente hepático tras un periodo de ganancia volumétrica [34]. Finalmente, surgen otras técnicas de hepatectomía en dos tiempos combinadas con embolización o ligadura portal, donde en un primer tiempo, junto a la embolización o ligadura de la rama portal del lóbulo con mayor carga tumoral, se efectúa metastasectomías en el remanente hepático futuro no deportalizado; para en una segunda etapa reseca el lóbulo previamente ligado/embolizado [23, 35, 36].

Todas estas técnicas diseñadas para optimizar el remanente hepático aprovechando la capacidad regenerativa del órgano, buscan ampliar el número de pacientes que se beneficiarían del tratamiento quirúrgico resectivo, no obstante, los procedimientos con mayor aceptación y uso corresponden a la embolización/ligadura portal preoperatoria, que junto a las otras técnicas, presentan en común la privación de flujo portal hacia la porción hepática comprometida con tumor y el subsecuente aumento del flujo hacia el remanente hepático que se desea preservar.

Un metaanálisis que incluyó 1088 pacientes sometidos a embolización portal preoperatoria, muestra que la ganancia de volumen del remanente hepático fue entre 8-27% en

un periodo de 2-6 semanas, siendo realizada la hepatectomía a los 60 días post procedimiento [37]. La tasa de morbilidad observada post embolización portal fue 2,2%, sin mortalidad reportada; mientras que la morbilidad tras la resección quirúrgica alcanzó el 16% con una mortalidad post operatoria de 1,7% [37]. El aumento de volumen adquirido mediante esta técnica, a su vez se ha correlacionado con una mejor función hepática, disminuyendo la incidencia de insuficiencia hepática post operatoria establecida entre 0,8-3% tras hepatectomías extendidas post embolización [37, 38].

Estudios comparativos que evalúan ligadura con embolización portal, muestran que ambas técnicas son equivalentes en cuanto a ganancia volumétrica del remanente hepático [39, 40]. Así, el aumento de volumen reportado tras ligadura portal alcanza  $38 \pm 26\%$  en un periodo de  $8 \pm 3$  semanas versus  $35 \pm 38\%$  en  $7 \pm 3$  semanas con embolización, sin diferencias significativas entre ambas [39]. Aun cuando existen trabajos que señalan una discreta mayor ganancia de volumen del remanente hepático tras embolización portal comparado con ligadura [41, 42], la evidencia es controversial, sin haberse demostrado una clara superioridad entre ellas, mientras que las tasas de morbimortalidad en ambas son muy bajas y comparables [37, 39-42].

Si bien, tanto la embolización como la ligadura portal han demostrado ser procedimientos seguros, la tasa de no resecabilidad, es decir, la proporción de pacientes en que no fue posible la resección hepática alcanza 27-30% [37, 39, 40], cifra comparable a la de pacientes sometidos a distintos tipos de hepatectomías en dos tiempos con o sin ligadura/embolización portal [34-36, 43]. Así, las causas más frecuentes de no resecabilidad corresponden a hipertrofia insuficiente y/o progresión de la enfermedad neoplásica, esta última situación observada en más de 2/3 de los casos en que no fue posible la resección [37].

Tras la embolización o ligadura de una rama portal, el aumento de volumen del tejido hepático no deportalizado sigue una curva ascendente durante las primeras 3 semanas, alcanzando un *plateau* que se mantiene hasta aproximadamente las 8 semanas post procedimiento [44]. Durante este periodo, se ha observado que junto al aumento del volumen del parénquima hepático sano, ocurre también un incremento significativo del tamaño de las lesiones hepáticas en una proporción relativamente similar, asociado a un aumento en la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 en las lesiones metastásicas [45]. A su vez, en este mismo estudio, se constató que los pacientes sometidos a embolización portal previo a la resección de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal, presentaban una menor sobrevida libre de enfermedad comparado a aquellos resecados no embolizados, si bien la sobrevida global a largo plazo no presentó variación significativa [45]. En este sentido, un estudio experimental ha demostrado que las lesiones metastásicas de cáncer de colon en hígado de ratones, experimentan un significativo aumento de tamaño y de la actividad proliferativa intratumoral tras la realización de ligadura portal, situación que no se reproduce en animales sometidos a hepatectomía sin ligadura portal previa, bajo las mismas condiciones [46].

Es decir, todos estos hallazgos indican que si bien la embolización/ligadura portal son procedimientos seguros que inducen hipertrofia y disminuyen el riesgo de insuficiencia hepática post quirúrgica, una proporción significativa de pacientes –al menos 1/3- no lograrán cumplir con el segundo tiempo resectivo debido a hipertrofia insuficiente, o a que mientras ocurre la ganancia volumétrica del tejido hepático, existe una significativa progresión tumoral de las lesiones metastásicas y/o de la enfermedad de base, impidiendo la resección quirúrgica en forma segura.

### **1.3 ALPPS: *Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy***

Ante las dificultades técnicas planteadas respecto al manejo quirúrgico de las metástasis hepáticas, es que en forma incidental se ha desarrollado en los últimos años una nueva estrategia quirúrgica que permitiría superar, al menos parcialmente, los problemas señalados. La asociación de ligadura portal y transección del parénquima hepático, cuyo acrónimo en inglés es “ALPPS” –*Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy*- [47], corresponde a una nueva técnica operatoria efectuada por primera vez por Hanns Schlitt, en el contexto de una hepatectomía derecha extendida en un paciente con colangiocarcinoma perihiliar.

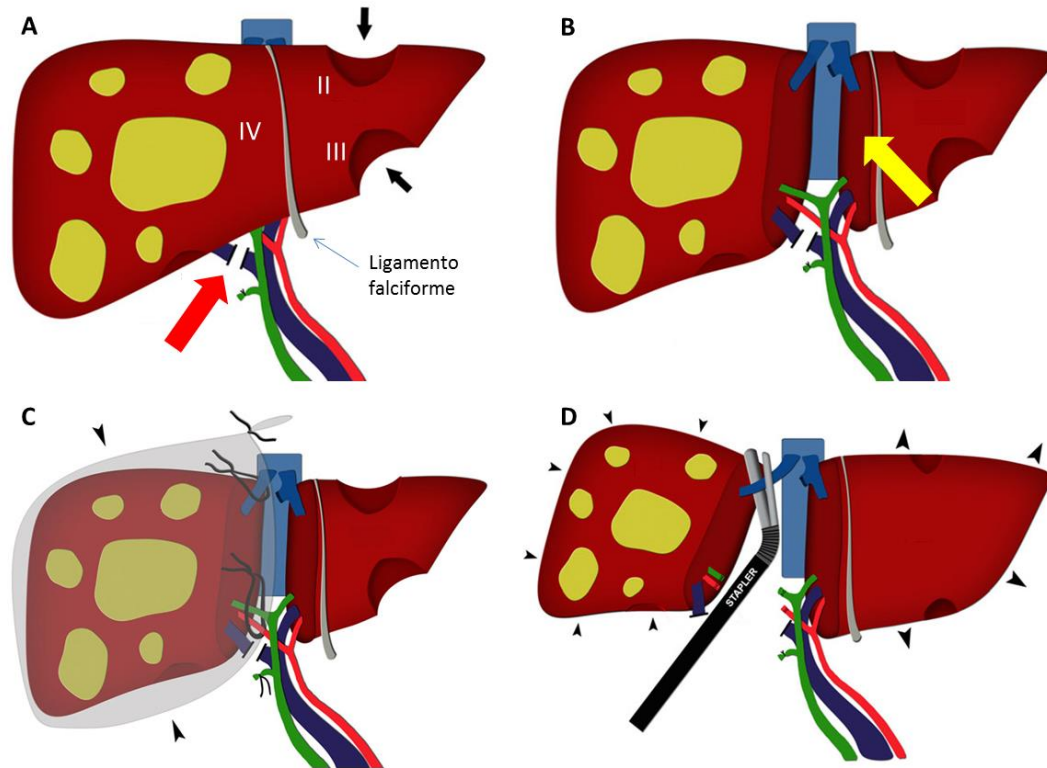
Durante la resección oncológica, el cirujano advierte un remanente hepático insuficiente y colestásico por obstrucción biliar tumoral, decidiendo derivar la vía biliar de éste al tubo digestivo –hepaticoyeyuno anastomosis- que para su óptimo posicionamiento complementa con una transección del parénquima a lo largo del ligamento falciforme, similar a la técnica de “*split in situ*” empleado en trasplante hepático pediátrico. A su vez, para aumentar el volumen del remanente, liga la rama portal del lóbulo hepático derecho, manteniendo a éste último *in situ*. Así, al 8° día Schlitt y col. objetivaron un incremento del volumen del tejido hepático remanente no deportalizado, de magnitud sorprendentemente mayor al esperado tras una ligadura portal –sin partición hepática-, completando en un 2° tiempo la hepatectomía inicialmente planificada [47].

Tras esta experiencia inicial, Lang y col. el 2011 efectúan un primer reporte de 3 casos de pacientes sometidos a esta técnica [48], sin embargo, Schnitzbauer y col. el año 2012 publican la primera serie multicéntrica de 25 pacientes sometidos a ALPPS en el contexto de

hepatectomías derechas extendidas por tumores primarios hepáticos y metastásicos principalmente de origen colorrectal [49]. En este trabajo, se objetiva una significativa ganancia de volumen del remanente hepático el que equivale a un aumento absoluto de 225 ml (54-490), correspondiente a un 74% (21-192;  $p < 0,001$ ) de incremento volumétrico relativo post procedimiento, con una variación en la relación del remanente hepático/masa corporal total precirugía de 0,38% a 0,61%; en un periodo de 9 días (5-28), lo que supera ampliamente los resultados obtenidos con otras técnicas de hepatectomía en dos tiempos con o sin embolización/ligadura portal, tanto en términos volumétricos –absolutos y relativos-, como en el marco temporal en el que este acontece.

Desde el punto de vista técnico, el ALPPS fue descrito para la realización de hepatectomías derechas extendidas, que considera la resección de 5 de los 8 segmentos hepáticos en dos tiempos operatorios. Así, en un primer tiempo quirúrgico, una vez disecado y controlado el pedículo portal derecho mediante sección y ligadura de la rama derecha de la vena porta, se efectúa una partición o “*split in situ*” del tejido hepático, separando anatómicamente los segmentos II-III correspondientes al lóbulo hepático izquierdo –que junto al segmento I conforman el remanente hepático futuro-, del resto del hígado –el lóbulo derecho más el segmento IV- (Figura 1). Así, en el ALPPS no se interviene la rama arterial del pedículo del lóbulo hepático derecho, ni el drenaje venoso de las tres venas suprahepáticas, preservándose además el flujo biliar de ambos lóbulos hepáticos, mientras se conserva el tejido hepático comprometido en el lecho quirúrgico. En el segundo tiempo operatorio, efectuado habitualmente dentro de 9 días tras la comprobación del incremento volumétrico de los segmentos izquierdos no deportalizados (I-II-III), se completa la resección quirúrgica del lóbulo hepático derecho junto al segmento IV, tras sección y ligadura de los elementos

vasculares arteriales y venosos, y de la vía biliar hepática derecha, previa liberación de los ligamentos falciforme, triangulares y coronarios que fijan el hígado al diafragma y a la pared posterior del abdomen [50, 51] (Figura 1).



**Figura 1.** Técnica de ALPPS para hepatectomía derecha extendida.

A. Ligadura de vena porta derecha (flecha roja). Se indica la ubicación de segmentos II, III y IV, junto al ligamento falciforme. B. Transección hepática y separación de segmentos II-III del IV (flecha amarilla). C. Liberación lóbulo hepático derecho, se deja *in situ* opcionalmente rodeado con bolsa estéril para evitar adherencias post quirúrgicas. D. Tras ganancia volumétrica se disecciona arteria y vía biliar derecha, junto a vena suprahepática ipsilateral con stapler vascular. Flechas negras, indican metástasis resecadas en remanente hepático. Puntas de flechas, indican crecimiento de remanente y/o disminución –atrofia- de volumen del lóbulo ligado. Imagen modificada de Álvarez et al. J. Gastrointest Surg (2013) 17:814-821.

Es decir, en esta técnica quirúrgica se combina la ligadura portal –con conservación del flujo arterial-, junto a la partición del parénquima, estableciéndose una exclusión anatómica y funcional del hígado en 2 porciones, entre el remanente hepático futuro y el tejido que se desea reseca. De esta forma, siguiendo estos principios quirúrgicos se han publicado variaciones a la técnica “clásica” descrita, a la que se agregan el “ALPPS izquierdo”, donde se

liga la rama portal del lóbulo hepático izquierdo, se resecan las metástasis presentes en el lóbulo hepático derecho y se efectúa la transección siguiendo la fisura umbilical; así como el “ALPPS derecho” donde se ocluye la rama posterolateral de la rama derecha de la vena porta, reseándose los segmentos II-III junto a las metástasis presentes en segmentos mediales izquierdos, anteriores derechos y/o en el caudado, asociándose la partición hepática a nivel de la fisura portal derecha [52]. En teoría, se podrían efectuar una serie de variaciones técnicas mientras se cumpla con los principios quirúrgicos señalados, posibilitando la realización en forma más segura de trisegmentectomías izquierdas y otras resecciones anatómicas hepáticas atípicas [47].

Schnitzbauer y col. mostraron en su serie una tasa de reseabilidad de 100%, es decir, en todos los pacientes sometidos ALPPS se logró completar el segundo tiempo resectivo, con una tasa de morbilidad de 64% y mortalidad de 12%, mientras que ningún paciente desarrolló insuficiencia hepática post operatoria irreversible [49]. Así, aunque la mayoría de las publicaciones que evalúan los resultados clínicos de ALPPS representan pequeñas series de casos retrospectivas o prospectivas, incluyendo pacientes heterogéneos con múltiples lesiones hepáticas de diverso origen, los niveles de hipertrofia resultan comparables a los observados por Schnitzbauer con ganancia volumétrica del remanente entre 61-93% en una media de 9-14 días [53, 54], junto a tasas de reseabilidad entre 95-100% [54], significativamente superiores a las obtenidas con embolización/ligadura portal previo a resección o asociada a hepatectomía en dos tiempos, si bien no existen estudios comparativos randomizados que evalúen ambas técnicas.

En este contexto, existe un único estudio comparativo multicéntrico –no randomizado– que evalúa una serie prospectiva de pacientes sometidos a ALPPS (n=48) versus cohortes



históricas de embolización/ligadura portal (n=83), siendo ambos grupos comparables en términos clínico-oncológicos, así como en compromiso tumoral hepático y nivel de remanente hepático futuro estimado preoperatorio [55]. Así, este trabajo objetiva una significativa mayor ganancia volumétrica del remanente hepático en el grupo ALPPS versus embolización/ligadura portal, siendo 77,4% (52,8-101,7) y 34,1% (17,4-55,7)  $p < 0,001$  respectivamente; lo que se correlacionó con una cinética extrapolada de crecimiento volumétrico en grupo ALPPS 11 veces mayor respecto al grupo con embolización/ligadura portal, siendo 34,8 mL/día (26,4-48,5) y 2,78 mL/día (1,69-5,81)  $p < 0,001$ , respectivamente para ambos grupos [55]. A su vez, en la totalidad de los pacientes sometidos a ALPPS se pudo completar la resección, quedando R0 el 83,3%, mientras que en sólo el 66% de los casos de embolización/ligadura portal se efectuó la hepatectomía [55].

De esta manera, la técnica de ALPPS optimiza el tejido hepático remanente a expensas de hipertrofia y/o hiperplasia del parénquima [49], lo cual permitiría alcanzar niveles de suficiencia que posibilitarían una resección hepática segura en forma mucho más precoz, resultando en mayores tasas de resecabilidad, toda vez que disminuye la probabilidad de hipertrofia insuficiente y/o progresión de la enfermedad [55, 56]. Esto se manifiesta en tasas de resecabilidad cercanas a 96% a 30 días en pacientes sometidos a ALPPS, en comparación a sólo un 12% del grupo embolización/ligadura portal en el mismo periodo, acortándose significativamente el intervalo de tiempo hasta la resección [55]. Así, tales evidencias sugieren que ALPPS permitiría la resección de pacientes previamente considerados irresecables o marginalmente resecables, ampliando las posibilidades de resección y tratamiento efectivo en pacientes terapéuticamente límites [51].

A pesar de las aparentes ventajas que presenta la técnica de ALPPS en el manejo de pacientes que requieren hepatectomías mayores, existen importantes controversias en relación a la seguridad clínica del procedimiento. En este sentido, la morbilidad en la mayoría de las series iniciales de ALPPS se cifra entre 16-70% [49, 53, 57], incluyendo una mortalidad perioperatoria entre 0-28% [49, 53-57]. Estos índices superan lo observado en hepatectomías convencionales mayores cuyas tasas de morbilidad alcanzan 20-50%, con mortalidad perioperatoria entre 5-12%, dependiendo de la extensión de la resección, de la enfermedad subyacente, de la condición tanto del paciente como del hígado, y del tiempo operatorio [58-60].

La mayoría de las complicaciones post operatorias observadas en ALPPS corresponden a sepsis y filtraciones biliares, siendo de incidencia menor la insuficiencia hepática post operatoria, de características habitualmente transitoria y reversible, lo que no varía mayormente respecto a casos de embolización/ligadura portal [55], y tal como lo observado en hepatectomías mayores convencionales, éstas representan las causas principales de mortalidad post quirúrgica [51, 55, 61]. La sepsis post operatoria intraabdominal observada en este contexto, se ha asociado a la significativa desvascularización del segmento IV hepático, el que en ocasiones queda privado tanto de flujo venoso portal como arterial tras la transección del parénquima, aumentando el riesgo de necrosis isquémica e infección secundaria, por lo que se ha sugerido la remoción del segmento IV en el primer tiempo operatorio de ALPPS a fin de prevenir esta complicación [62], si bien, la utilidad de tal maniobra quirúrgica no ha sido demostrada.

Así también, se ha publicado en una serie de ALPPS, que la realización de algún tipo de drenaje biliar se ha asociado a mayores tasas de sepsis de origen intraabdominal y filtración

biliar [63], siendo esta última complicación –en particular la que requiere algún tipo de intervención para su resolución-, pesquisada hasta en el 24% de los ALPPS realizados [49, 55], superando la tasa de 10% de filtraciones biliares de este tipo observadas en hepatectomías mayores y menores [64, 65]. Así, los factores predictivos asociados a esta complicación en cirugía hepática corresponden a la realización de una hepatectomía mayor, la resección de un tumor tipo colangiocarcinoma perihiliar, y resecciones de los segmentos I y/o IV hepáticos [61]; al respecto, es importante destacar que en el ALPPS “clásico” se efectúa una hepatectomía extendida, con resección del segmento IV, lo que implica una cirugía de mayor complejidad técnica, asociada en la mayoría de las series iniciales, a una significativa morbimortalidad principalmente en pacientes >70 años, con tumores primarios hepáticos y/o que comprometen la vía biliar, si bien, tales series no logran establecer desde un punto de vista estadístico, factores predictivos para estas complicaciones [55].

Resultados clínicos más definitivos se han obtenido con el primer reporte del registro internacional de ALPPS, que incluyó a 202 pacientes de distintos centros a nivel mundial [66]. Así, se establece un 80% de hipertrofia del remanente en una media de 7 días, identificándose a la edad >60 años, la necesidad de oclusión del pedículo portal durante la 1° etapa del ALPPS, y a la alteración del parénquima hepático por esteatosis, fibrosis o secundario a quimioterapia, a una menor ganancia volumétrica del remanente y a una menor cinética de crecimiento [66].

Además, las complicaciones mayores o severas tipo III-IV de Clavien Dindo, es decir, aquellas que requieren para su manejo de algún procedimiento radiológico, endoscópico o quirúrgico bajo sedación (IIIa) o anestesia general (IIIb), o el desarrollo de disfunciones orgánicas que amenazan la vida del paciente (IV) [67]; se observaron en el 42% de los

pacientes del registro de ALPPS [66], cifra similar al 40% de complicaciones  $\geq$ IIIa reportada por Schnitzbauer [49], y que superan al 33% observado en la serie de 144 pacientes del MD Anderson sometidos a embolización portal preoperatoria combinado o no con hepatectomía en dos tiempos [68]. Sin embargo, en este último trabajo el 78% (n=112) de los pacientes fueron sometidos a embolización portal seguido de resección hepática en un sólo tiempo operatorio, sin la necesidad de hepatectomía en dos tiempos, situación en la que la tasa de morbilidad se tiende a igualar a la observada en pacientes sometidos a ALPPS, cuyas cifras alcanzan el 15 y 50% para el primer y segundo tiempo quirúrgico en pacientes resecados mediante estas técnicas [34-36, 69].

Es así, como la tasa de complicaciones severas  $\geq$ IIIb, incluyendo la mortalidad –tipo V de Clavien Dindo- en el reporte internacional de ALPPS fue 27%, siendo la necesidad de transfusión perioperatoria de glóbulos rojos, el tiempo operatorio  $>6$  horas en la primera cirugía de ALPPS, la edad  $>60$  años y las lesiones tumorales hepáticas de origen no colorrectal, los principales factores de riesgo asociados a complicaciones mayores [66], destacando que el grupo de pacientes que cumplen con las dos últimas características concentran la mayor morbimortalidad, con una incidencia de 49% para complicaciones IIIb-V, mientras que aquellos pacientes más jóvenes  $<60$  años y con metástasis hepáticas de origen colorrectal, presentan una morbimortalidad significativamente menor que alcanza el 16% para complicaciones de tipo  $\geq$ IIIb [66]. A su vez, la mortalidad a 90 días de los 202 pacientes seguidos en este registro es 9%, tasa similar a la observada en hepatectomías en dos tiempos cuya mortalidad perioperatoria se encuentra entre 6-8% [34-36, 69], sin embargo, en aquellos pacientes de este reporte menores de 60 años y con lesiones hepáticas de origen colorrectal, tal cifra baja a 5,1% [66].

De esta manera, los resultados mostrados en este primer registro internacional de ALPPS, que constituye la serie más amplia estudiada a nivel mundial, son compatibles con observaciones de las primeras series publicadas de pacientes sometidos a esta cirugía, que sugieren mayores complicaciones en pacientes añosos con tumores hepáticos primarios o secundarios de origen no colorrectal, en especial aquellos que comprometen la vía biliar, observación corroborada para colangiocarcinoma del tipo perihiliar e intrahepático en este registro [66].

A la fecha se desconocen los eventos fisiológicos que participan en la gran ganancia volumétrica del remanente hepático inducida por ALPPS, sin embargo, se cree que ocurriría en base a tejido hepático hiperplásico [49] a consecuencia de una significativa respuesta regenerativa gatillada tanto por la ligadura portal como por la partición del parénquima, cuyos estímulos debieran ser al menos complementarios, si no sumatorios o sinérgicos; mientras que a su vez, no existen certezas respecto a sus propiedades funcionales.

De esta manera, algunos autores han planteado desde un punto de vista estrictamente teórico, que el remanente hepático rápidamente regenerado adolecería de importantes insuficiencias funcionales, sin embargo, esto se contrapone a la baja tasa de insuficiencia hepática observada post ALPPS [49], mientras que estudios funcionales con ácido dimetil iminodiacético marcado con Tc-99 muestran que el lóbulo “deportalizado”, que a su vez mantiene su perfusión arterial, contribuye hasta con el 60% de la función hepática total a una semana post ALPPS [70], tiempo que permitiría una compensación hipertrófica/hiperplásica y funcional suficiente del remanente como para enfrentar las demandas fisiológicas tras la resección del lóbulo comprometido, funcionando éste último durante este periodo crítico,

como un hígado “auxiliar” que asiste fisiológicamente al remanente que se encontraría en activa regeneración [47, 70].

#### **1.4 Mecanismos de regeneración hepática**

Existen distintos modelos experimentales en animales que han permitido el estudio de los mecanismos implicados en regeneración hepática, los cuales consideran tanto métodos farmacológicos, modelos de injuria hepática preexistente secundario a defectos genéticos específicos, así como modelos quirúrgicos, ya sea mediante la aplicación de ligadura portal o hepatectomías parciales [71], siendo este último el más utilizado, tras la resección del 70% –ó 2/3- del tejido hepático de ratas [30], si bien, también es posible efectuar hepatectomías parciales de 85-90% y subtotaes 95-97% con este fin [29]. Es decir, en cada uno de estos modelos se induce algún tipo de injuria parenquimatosa, disminución de la masa hepática y/o ajuste del flujo portal, que conducen a la recuperación completa del tejido hepático previo a la intervención, obtenida en base a fenómenos de hiperplasia e hipertrofia compensatoria – término más correcto en vez de *regeneración*-, donde las células hepáticas junto a las células no parenquimatosas –células de Küpffer, células endoteliales sinusoidales, células estrelladas y células madres pluripotenciales- salen de su estado quiescente y entran activamente al ciclo celular y proliferación [72, 73], estableciéndose durante este proceso múltiples interacciones celulares, a través de distintos tipos de moléculas, citoquinas y factores de crecimiento [73].

El proceso de regeneración hepática comprende las fases de iniciación –o “*priming*”-, proliferación –o expansión-, remodelación y terminación [72]. En la etapa de iniciación las células hepáticas se preparan para la fase replicativa, adquiriendo alta reactividad a moléculas con propiedades mitógenas [74]. Las células de Küpffer, una vez activadas por distintas señales estimuladoras aún bajo investigación, entre ellas lipopolisacáridos, moléculas del

complemento C3a-C5a e ICAM inducen la producción y secreción de TNF- $\alpha$ , cuyos efectos autocrinos mediados por NF- $\kappa$ B, gatillan la liberación de IL-6 que se une a su receptor localizado en las células hepáticas, donde la activación de STAT3 a nivel intracelular determina una mayor sensibilidad a señales de proliferación, transición de G0/G1 y la producción –en las células estrelladas- del factor de crecimiento de hepatocitos –HGF- entre otros, que posibilitan el proceso mitótico y previenen la apoptosis [72-75].

Durante la fase de proliferación, el HGF sintetizado de novo y presente en la matriz extracelular en forma de un precursor inactivo, pro-HGF, es activado mediante un sistema fibrinolítico que involucra al activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA), plasmina y metaloproteinasas de la matriz extracelular. Así, el HGF una vez activo se une a su receptor c-met, promoviendo la síntesis de DNA, progresión del ciclo celular, crecimiento y protección celular [76]. En esta fase participan además otros factores de crecimiento pertenecientes a la familia del factor de crecimiento epitelial (EGF), tales como TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , anfiregulina y HB-EGF [77]; junto a otras moléculas como IGF-1, insulina, IL-1 y TNF- $\alpha$  [78, 79]. De esta manera, la proliferación de hepatocitos que comienza en la región periportal (zona 1) después de un intervalo típico de 24 hrs, y que se continúa en la región pericentral (zona 3) después de 36-48 hrs [80], presenta a partir del tercer día post hepatectomía parcial 70% en ratas, grupos de hepatocitos desinusoidalizados dispuestos a lo largo de ejes vasculares inmaduros, lo que inicia un proceso de remodelación con desarrollo de vasos sinusoidales, que involucra la acción de VEGF, angiopoyetinas y la síntesis de matriz extracelular [71, 81, 82], para finalmente al séptimo día, alcanzar la recuperación completa de la pérdida tisular con restauración del índice masa hepática/masa corporal y normalización de la función orgánica

[71], permaneciendo las señales moleculares de terminación pobremente entendidas, donde se ha postulado a TGF- $\beta$  como un mediador central de esta fase [78].

Como se advierte, todo el fenómeno es regulado por un conjunto de moléculas, citoquinas y factores de crecimiento que según sus propiedades mitógenas pueden ser consideradas de tipo primarios –o “mitógenos completos”-, debido a que su administración en cultivos celulares de hepatocitos en medios libres de suero y en animales de experimentación inducen síntesis de DNA y replicación celular; o de tipo secundarios –o “mitógenos auxiliares”-, los cuales no muestran tales respuestas replicativas ante similares condiciones, si bien su inhibición causa un retardo, pero no la abolición de la regeneración hepática [78]. Así, forman parte del primer grupo HGF y su receptor c-met, junto a ligandos del receptor de EGF (EGF, TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , anfiregulina y HB-EGF), mientras que se consideran mitógenos secundarios a una amplia lista de mediadores entre los que destaca TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF y sus receptores, insulina, ácidos biliares, serotonina, proteínas del complemento, leptina y norepinefrina, entre otros [78].

### **1.5 Estímulos asociados a regeneración hepática, rol del *shear stress***

Modelos de estudios quirúrgicos mediante ligadura portal o hepatectomía, han intentado evaluar los estímulos implicados en el origen de la respuesta molecular y regenerativa previamente señalada, habiéndose establecido que la ligadura portal en distintas especies es capaz de inducir una respuesta regenerativa en los lóbulos no ligados, mientras que produce atrofia en el parénquima ligado [28, 71, 83]. Sin embargo, la magnitud de la hipertrofia e hiperplasia compensatoria en el remanente hepático de ratas sometidas a ligadura portal es altamente variable, mientras que la atrofia observada es un fenómeno facultativo y no necesariamente inevitable [28]. Así también, se ha cuantificado una significativa menor



respuesta regenerativa en ratas sometidas a ligadura portal comparada a la hepatectomía parcial [71], a la vez que, posterior a la ligadura portal, existe cierto retardo tanto en el crecimiento de tejido hepático como en la expresión de marcadores de proliferación en hepatocitos [84], no obstante, se ha atribuido en ambos casos al efecto del estrés hemodinámico o “*shear stress*”, el origen de las respuestas observadas.

Tras la realización de una hepatectomía parcial del 70% en ratas se producen profundos cambios hemodinámicos caracterizados por un aumento del flujo portal ( $0,9 \pm 0,3$  a  $2,2 \pm 0,26$  mL/min/g), junto a un leve descenso del flujo arterial ( $0,4 \pm 0,12$  a  $0,33 \pm 0,03$  mL/min/g), mientras que el flujo total de sangre experimenta un significativo ascenso ( $1,3 \pm 0,39$  a  $2,53 \pm 0,26$  mL/min/g), que se corresponde con un aumento de la presión portal de  $8,8 \pm 0,7$  a  $11,9 \pm 1,7$  cmH<sub>2</sub>O [29]. Es decir, se establece un estado de hiperperfusión del tejido hepático remanente, en el que el *shear stress* representaría un estímulo principal toda vez que éste precede a la expresión de factores humorales asociados a regeneración hepática [85]. De esta manera, se ha observado que el *shear stress* induce un incremento de la actividad de la urokinasa (dentro de 5 minutos), la migración de  $\beta$ -catenina a núcleos de hepatocitos (en 5 min) y señalización de Notch1 (en 15 minutos) y expresión de VCAM-1, CD44 y NOS, junto a expresión de c-fos, c-myc y c-jun en células endoteliales vasculares [85-88]. A su vez, experimentos *in vitro* con células endoteliales de sinusoides hepáticos, han demostrado que el *shear stress* incrementa los niveles de expresión de mRNA de VEGFR-1, VEGFR-2 y neurofilina-1, a lo que se agregan cambios ultraestructurales consistentes con fusión de fenestras y disrupción del alineamiento endotelial [89], lo que se condice con modelos *in vivo* de hepatectomía en que se ha observado un aumento en la permeabilidad sinusoidal secundario a la disminución de las adherencias célula-célula y a aumento de espacios

intercelulares, lo que contribuiría a la degradación de la matriz extracelular [90], uno de los eventos asociados a regeneración hepática.

Sin embargo, estos estudios *in vivo* no han separado el efecto de la hiperperfusión portal de aquellos secundarios a la hepatectomía. Así, en un modelo de cerdo sometido a un incremento de perfusión sinusoidal en los segmentos II-III-IV hepático mediante un *shunt* vascular desde la aorta a la rama portal izquierda, sin hepatectomía, se observó que tales segmentos sometidos a mayor *shear stress*, presentan una disminución en el perfil de expresión de genes asociados tanto a promoción del ciclo celular como a inhibición de apoptosis, mientras que la ganancia volumétrica hepática observada a 3 semanas de efectuado el *shunt* fue a expensas de tejido hepático no hiperperfundido [91], lo que sugiere que el estrés hemodinámico –*shear stress*- secundario a un flujo incrementado no es por sí, el estímulo adecuado ni primario para la regeneración [91].

Bajo condiciones fisiológicas, las alteraciones del flujo sanguíneo portal son contrarrestadas por cambios concomitantes en el flujo sanguíneo de la arteria hepática, por lo que un aumento del flujo portal se corresponde con una reducción del flujo arterial y viceversa [92]. La adenosina, con propiedades vasodilatadoras en la arteria hepática, es producida a una tasa constante independiente de la deuda de oxígeno tisular hacia el espacio de Mall, de manera que un incremento del flujo portal genera una disminución de la concentración local de adenosina, lo que se traduce en vasoconstricción de pequeñas arteriolas con la subsecuente reducción del flujo de entrada arterial, y con ello, una disminución de la presión parcial de oxígeno tisular, mientras que la situación inversa se observa ante una reducción del flujo portal [92].

Sin embargo, este mecanismo de compensación hemodinámica es parcial, lo que permite explicar el deterioro de la respuesta regenerativa y el daño por hiperperfusión portal e hipoxia en remanentes hepáticos de ratas sometidas a hepatectomías masivas del 90%, que se revierte ante la modulación quirúrgica de la circulación portal hiperdinámica mediante una esplenectomía, lo que mejora la respuesta regenerativa del remanente y la supervivencia de los animales, al aumentar al doble la presión parcial de oxígeno tisular [93], a través de una completa compensación que este mecanismo permite respecto a la cantidad de oxígeno, lo que reduce el estrés hipóxico y optimiza la carga energética de los hepatocitos [85, 93]. Así, tales principios fisiológicos han sido aplicados con éxito en el diseño de estrategias terapéuticas – mediante esplenectomía o *shunts* portosistémicos- para el manejo clínico de pacientes con injerto hepático trasplantado pequeño en el que se observa daño secundario a hiperperfusión tisular –“*small for size syndrome*”- [94, 95]. En este sentido, pareciera entonces que la respuesta metabólica dependiente de la disponibilidad de oxígeno, y posiblemente también de otros mediadores presentes en el flujo sanguíneo aferente del hígado, exhibe significativas propiedades moduladoras en el proceso regenerativo hepático.

### **1.6 Respuesta metabólica asociada a regeneración hepática: rol de AMPK/mTOR**

Las ratas sometidas a un estímulo regenerativo ya sea quirúrgico –mediante hepatectomía parcial- o por injuria tóxica, desarrollan una serie de alteraciones del metabolismo hepático y sistémico, que preceden a la aparición de la respuesta proliferativa hepatocelular, y que se resuelven con la restauración de la masa hepática normal [96]. De esta manera, tras la hepatectomía parcial 70% se desarrolla precozmente una significativa hipoglicemia, resultado de la remoción de 2/3 del contenido de glicógeno hepático y de la capacidad gluconeogénica [96, 97], que se contrarresta con la inducción de la maquinaria

gluconeogénica y la supresión de la actividad glicolítica [98], que aun cuando limitan la disminución de la glicemia, acontece en detrimento de la producción de ATP derivada de la glucosa. Esto induce a las 12 hrs post cirugía, una significativa respuesta catabólica sistémica con disminución del tejido adiposo y de la masa magra [99], lo que se corresponde con una marcada esteatosis y acumulación de triglicéridos en el hígado en regeneración, como resultado de la captación de ácidos grasos libres plasmáticos, cuya concentración aumenta producto de la lipólisis del tejido adiposo inducido por hipoglicemia [99, 100]. A su vez, aminoácidos gluconeogénicos, cetogénicos y de cadena ramificada, así como los relacionados al ciclo de la urea, derivados de la proteólisis sistémica, elevan su concentración plasmática y se acumulan en el hígado en regeneración [101].

La importancia de tales alteraciones metabólicas en el proceso de regeneración hepática en cuanto a su estímulo y modulación, quedan de manifiesto toda vez que la restricción calórica, es decir, la inducción y perpetuación del estado hipoglicémico en ratas sometidas a hepatectomía parcial, acelera el inicio de la proliferación hepatocelular [102], mientras que el aporte de glucosa se asocia a supresión de la acumulación de ácidos grasos hepáticos y a deterioro de la respuesta regenerativa hepática [97], con aumento de la expresión de ciclinas inhibitorias del ciclo celular [97]. Por otro lado, la suplementación exógena de ácidos grasos en modelos *in vivo* de regeneración post hepatectomía, así como en cultivos primarios de hepatocitos, promueve la acumulación lipídica y la proliferación hepatocelular [96, 103], mientras que el aporte de aminoácidos de cadena ramificada, aminoácidos esenciales adquiridos en la dieta, igualmente promueven la respuesta regenerativa [104], a la vez que la inhibición farmacológica de la captación de aminoácidos neutros por hepatocitos, la deteriora [105].

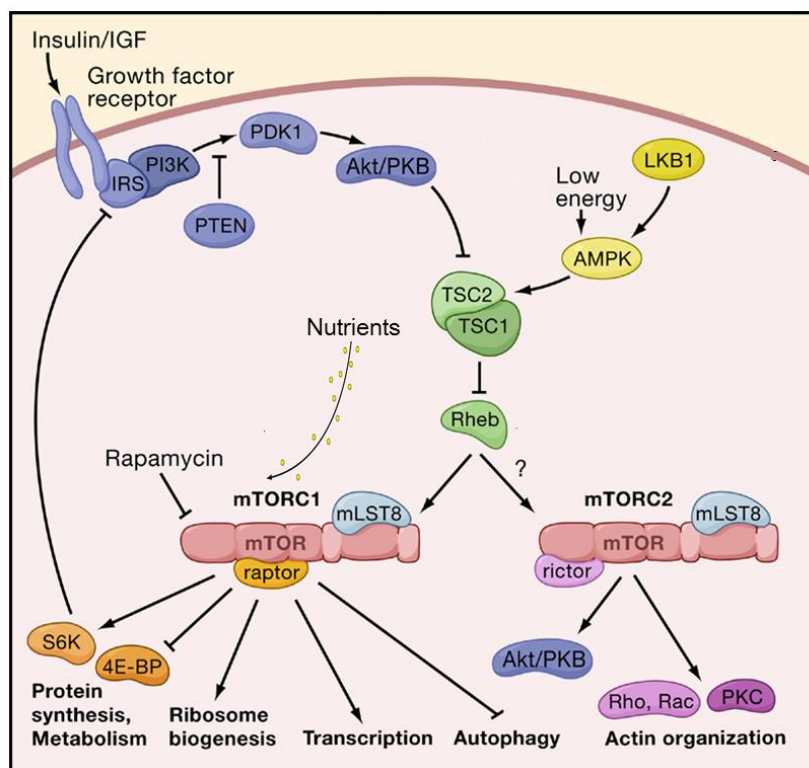
Como se ha señalado previamente, durante la respuesta hiperplásica hepática los hepatocitos periportales, los cuales se encuentran más cercanos al aporte sanguíneo aferente portal y sistémico, proliferan antes que los centrolobulillares –“más lejanos” del flujo de entrada hepática- [71, 80, 96], esto sumado a que en ratas unidas mediante circulación parabiótica la realización de hepatectomía en una de ellas induce síntesis de DNA en hepatocitos de la otra [106], sugieren la importancia de factores circulantes en la regulación de este proceso [78, 106]. La proporción relativa de moléculas contenidas en el flujo portal de ratas sometidas a modelos clásicos de ligadura portal o hepatectomía parcial 70%, teóricamente aumenta en razón de 3 veces por hepatocito perfundido en el remanente [78], así un conjunto de moléculas con posibles implicancias en señalización tales como glucosa, ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas, ácidos biliares, entre otros; muchos de los cuales constituyen conocidos mitógenos auxiliares en regeneración hepática, se suman a los efectos de moléculas particularmente presentes en el flujo portal tales como insulina, derivada del páncreas, y factor de crecimiento epitelial –EGF-, derivado de las glándulas de Brunner duodenales, siendo este último importante mitógeno primario hepático [78, 85, 107], lo que sugiere que tanto el inicio como la mantención de las fases de regeneración hepática podrían ser gobernadas por las características del flujo portal en cuanto a sus componentes.

En este contexto, EGF y moléculas relacionadas a éste (TGF- $\alpha/\beta$ , anfiregulina, epiregulina y HB-EGF) es capaz de unirse a su receptor (EGF-R), también conocido como ErbB o HER de los cuales existen 4 isoformas (ErbB-1/4 o HER-1/4) [108], constituyendo una familia de proteínas transmembrana de tipo tirosina kinasas, que son capaces de homo o heterodimerizar con otros receptores tirosina kinasa tales como el PDGF-R, HGF-R o receptor c-met y el receptor del factor de crecimiento similar a insulina IGF1-R [109]. Así, la

activación de estos receptores permite la inducción de distintas vías de señalización tales como Ras/Raf/MEK y vía de las MAPK kinasas; la vía de la fosfolipasa C/PKC y la vía de señalización de STAT, así como también, la vía de PI3K/Akt relacionada a la activación de mTOR, siendo este último, un regulador principal implicado en crecimiento celular y síntesis de proteínas [110]. La activación de PI3K, mediada también por IRS-1 –*insulin receptor substrate 1*- en respuesta a la acción de la insulina, cataliza la fosforilación de fosfatidilinositol bifosfato (PI-4,5-P2) presente en las membranas celulares a fosfatidilinositol trifosfato (PI-3,4,5,-P3), cuya reacción puede ser revertida por la fosfatasa PTEN [111]. La formación de PI-3,4,5-P3 permite el reclutamiento y unión de los sustratos PDK1 y Akt, siendo ambas proteínas kinasas que se fosforilan en forma cruzada, para así una vez activadas, fosforilar otras moléculas río abajo en la cascada de señalización que conducen a la activación de mTOR [72, 110, 112].

mTOR –*mammalian target of rapamicin*- es una proteína con actividad serina/treonina kinasa inicialmente descubierta en levaduras –*S. cerevisiae*- de la cual se describieron 2 complejos, mTORC1 y mTORC2, según el conjunto de moléculas a las que se asocia, siendo el primero inhibido por el compuesto rapamicina [110, 112]. Una vez activado, mTOR regula la síntesis proteica a través de la fosforilación e inactivación de una proteína represora de la traducción de mRNA llamado 4E-BP1 –*eukariotic translation initiation factor 4E binding protein 1*-, así como mediante la fosforilación y activación de la proteína ribosomal S6 kinasa, específicamente la subunidad p70S6K, también denominada S6K1. La particularidad de esta proteína mTOR, es que conforma un complejo molecular –mTORC1- y de señalización intracelular, cuya actividad es regulada tanto por factores de crecimiento, como por la disponibilidad de nutrientes y el metabolismo energético [110, 112].

Es así como mTOR se encuentra unido a dos proteínas, Raptor que es considerado un regulador positivo de la actividad de mTOR, y mLST8/GβL un estabilizador de tal interacción, conformando el complejo denominado mTORC1. En conjunto funcionan como un sensor de ciertos nutrientes, toda vez que la deprivación de aminoácidos estabiliza la interacción entre Raptor y mTOR, inhibiendo la actividad kinasa de éste, mientras que en presencia de aminoácidos se inducen cambios conformacionales que promueven la interacción eficiente entre mTOR-Raptor, permitiendo la actividad kinasa de mTOR y la unión a sus sustratos ya mencionados, S6K1 y 4E-BP1 [113], lo que estimula la síntesis de proteínas (Figura 2).



**Figura 2.** Vía de señalización y regulación de mTOR en células animales. Imagen modificada de Wullschleger et al. Cell. 2006;124(3):471-84.

Por otro lado, el complejo mTOR-Raptor-mLST8 –mTORC1-, es inhibido por el heterodímero conformado por las proteínas TSC1/TSC2 –*tuberous sclerosis complex*-, cuyas

mutaciones con pérdida de su función biológica conducen a la formación de hamartomas con células muy grandes en distintos órganos concordante con un aumento de la actividad de mTOR [112, 114]. Así, se ha demostrado que Akt fosforila e inactiva a TSC2 lo que resulta en activación de la función biológica de mTOR [115]. Aun cuando la forma en que TSC1/TSC2 inhibe mTOR no está plenamente dilucidada, se ha propuesto que tal represión ocurriría por la inactivación de una pequeña proteína del tipo GTPasa denominada Rheb, que se encuentra primariamente en las células animales en su forma activada unida a GTP, funcionando como un regulador positivo de mTOR [116]. Se ha propuesto que TSC1/TSC2 en forma basal incrementa la actividad GTPasa de Rheb, de manera que al mantenerse unido Rheb a GDP, es incapaz de promover la activación de mTOR [116]. Así, la fosforilación e inactivación de TSC1/TSC2 mediado por Akt, inhibe tal incremento de la actividad GTPasa de Rheb, con lo cual éste persiste unido a GTP, lo que da como resultado un aumento en la actividad de mTOR [72, 110, 112], sin embargo, la forma en que Rheb activa a mTOR no ha sido adecuadamente descrita (Figura 2).

Los procesos dirigidos por mTOR como la traducción de mRNA y la biogénesis ribosomal, consumen altas cantidades de energía celular, lo que sugiere que su actividad sea regulada por el estado energético de la célula [117], al objetivarse una disminución en la activación de mTOR inducido por insulina, luego de la deprivación de glucosa y la inhibición de la respiración mitocondrial [117]. En este contexto, AMPK –5'AMP-activated protein kinase-, proteína kinasa multimérica altamente conservada presente en diversos tejidos, cuya actividad en hígado estimula la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis, mientras que inhibe procesos anabólicos como síntesis de colesterol, lipogénesis y síntesis de triglicéridos [118-120], funciona como un sensor energético celular, debido a que su actividad es modulada



por cambios moderados en la relación AMP/ATP, siendo activada tras la disminución del ATP intracelular [119, 121]. La importancia del balance energético y la implicancia de AMPK sobre la respuesta regenerativa hepática ha sido sugerida, al evidenciarse en ratas sometidas a hepatectomía subtotal 90% un deterioro de la proliferación hepatocelular asociado a una activación de AMPK en respuesta a un déficit energético celular que implicaría una disminución secundaria de la activación de mTOR, situación que se revierte tras la administración de dieta con alto contenido energético [122].

De esta manera, se ha demostrado una acción inhibitoria de AMPK sobre mTOR, siendo implicado en tal fenómeno regulatorio la proteína TSC2, cuya actividad inhibitoria sobre mTOR aumenta tras su fosforilación por AMPK, a diferencia del efecto observado tras la fosforilación de TSC2 por Akt [123]. Es decir, a este nivel confluyen los efectos regulatorios sobre mTOR de vías que inducen respuestas antagónicas, toda vez que el estímulo de la acción de mTOR secundario a factores de crecimiento y/o disponibilidad de nutrientes, se contrarresta con la modulación ejercida por AMPK en relación a las necesidades energéticas celulares, siendo posiblemente el complejo TSC1/TSC2 clave en tal mecanismo regulatorio [110] (Figura 2). En este sentido, no se ha evaluado por completo en modelos *in vivo* de regeneración hepática la relación metabólica y energética que conduce a activación de AMPK y su efecto regulatorio mediado por TSC1/TSC2 sobre mTOR, ni tampoco las posibles implicancias que este mecanismo podría tener sobre la significativa compensación hipertrófica e hiperplásica del remanente hepático observada en un modelo de estudio de ALPPS.

Es así como al advertir las características de los efectores de mTOR y la naturaleza de la respuesta esencialmente anabólica que tras su activación gatilla en el metabolismo celular, no es difícil entender la posible relación existente entre mTOR y regeneración hepática, donde

la administración de rapamicina, un inhibidor selectivo de mTORC1, en ratas sometidas a hepatectomía parcial, genera un retardo en la proliferación de hepatocitos y de células no parenquimatosas, junto a la disminución de factores asociados a regeneración hepática [124].

La realización de ligadura portal y transección del parénquima hepático –ALPPS- probablemente representaría el estímulo de una serie de procesos biológicos que explicarían la significativa respuesta regenerativa hepática. Así, mientras la ligadura portal redistribuye todo el flujo hacia el remanente hepático que se desea preservar, generando algún grado de estrés hemodinámico en la respuesta inicial, la partición del parénquima que implica la ligadura de colaterales intraparenquimatosas y la separación anatómica del remanente del resto del tejido hepático, permitiría optimizar la redistribución no sólo del flujo portal, sino que además de todos los mediadores procedentes del flujo esplácnico, incluyendo factores de crecimiento, nutrientes y citoquinas con acción directa sobre el tejido hepático no ligado. A esto se agregaría la inducción de una respuesta inflamatoria local secundaria a la partición, que posiblemente favorecería el *priming* de los hepatocitos del remanente.

En este escenario, se propone que tales cambios podrían estar asociados a la activación de mTOR en los hepatocitos del remanente, que a su vez no presentaría un desbalance energético de gran magnitud, al conservarse *in situ* el resto del tejido hepático el cual, dentro de cierto rango, mantendría sus funciones biológicas y metabólicas, evitándose la inhibición mediada por AMPK de los procesos anabólicos del remanente en activa regeneración.

Con estos antecedentes, se plantea el estudio de tales inferencias mediante el diseño y estandarización de un modelo *in vivo* de ALPPS y su eventual correlato en hígado de pacientes sometidos a esta intervención.

## **II. Hipótesis**

El aumento de la masa hepática observada post ALPPS ocurre mediante la inducción de mecanismos de regeneración hepática dependientes de señales metabólicas que incluyen la activación de la vía de transducción de señales AMPK/mTOR.

## **III. Objetivo General**

Determinar los mecanismos implicados en la ganancia de masa hepática post ALPPS en un modelo animal y en pacientes, incluyendo el estudio de señales metabólicas y la participación de la vía AMPK/mTOR.

## **IV. Objetivos Específicos**

### **4.1 Estudios en modelo animal de ALPPS**

1. Estandarizar un modelo *in vivo* de ligadura portal asociada a partición del parénquima hepático (ALPPS) y cuantificar la ganancia de masa del remanente hepático.
2. Estudiar la respuesta regenerativa hepática mediante índices de recuperación de masa hepática, índice mitótico, y a través de la medición del marcador de proliferación hepatocelular Ki-67 en modelo experimental de ALPPS.
3. Estudiar la función hepática mediante niveles plasmáticos de transaminasas, albúmina y pruebas de coagulación en modelo *in vivo* de ALPPS.
4. Estudiar expresión de marcadores de progresión en regeneración hepática mediante cuantificación de TNF- $\alpha$ , IL-6, HGF y TGF- $\beta$  en modelo experimental de ALPPS.

5. Evaluar el estado metabólico sistémico y hepatocelular mediante glicemia, ácidos grasos libres plasmáticos, contenido de glicógeno y grado de esteatosis tisular hepática, junto a contenido lipídico hepatocelular inducido post ALPPS.
6. Estudiar la inducción de la vía de señalización AMPK/mTOR en el tejido hepático remanente inducido por modelo *in vivo* de ALPPS con western blot y qRT-PCR.
7. Determinar los efectos de la inhibición farmacológica de la activación de AMPK/mTOR con rapamicina en modelo experimental de ALPPS.

#### **4.2 Estudios en pacientes sometidos a ALPPS**

1. Describir las características clínicas y oncológicas de los pacientes con lesiones metastásicas hepáticas de cáncer colorrectal que requieren tratamiento quirúrgico mediante técnica de ALPPS, junto a morbilidad y mortalidad asociada a esta cirugía.
2. Medir el volumen del remanente hepático futuro en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer de colon y su ganancia volumétrica mediante estudios imagenológicos con tomografía computada de abdomen y pelvis, previo y posterior a la realización de ALPPS.
3. Estudiar parámetros de función hepática mediante pruebas de laboratorio clínico (perfil hepático y pruebas de coagulación) previo y en forma seriada posterior a la realización de ALPPS en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.
4. Estudiar la respuesta regenerativa hepática mediante índices de recuperación de masa hepática e índice mitótico, a través de la medición del marcador de proliferación hepatocelular Ki-67 en biopsias hepáticas tomadas previo y posterior a la realización de ALPPS.

5. Estudiar expresión de marcadores de progresión en regeneración hepática mediante cuantificación de TNF- $\alpha$ , IL-6, HGF, EGF y TGF- $\beta$  previo y posterior a ALPPS en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.
6. Estudiar la inducción de la vía de señalización AMPK/mTOR en hígados de pacientes sometidos a ligadura portal y transección del parénquima.

## V. Materiales y métodos

### 5.1 Estudios en animales

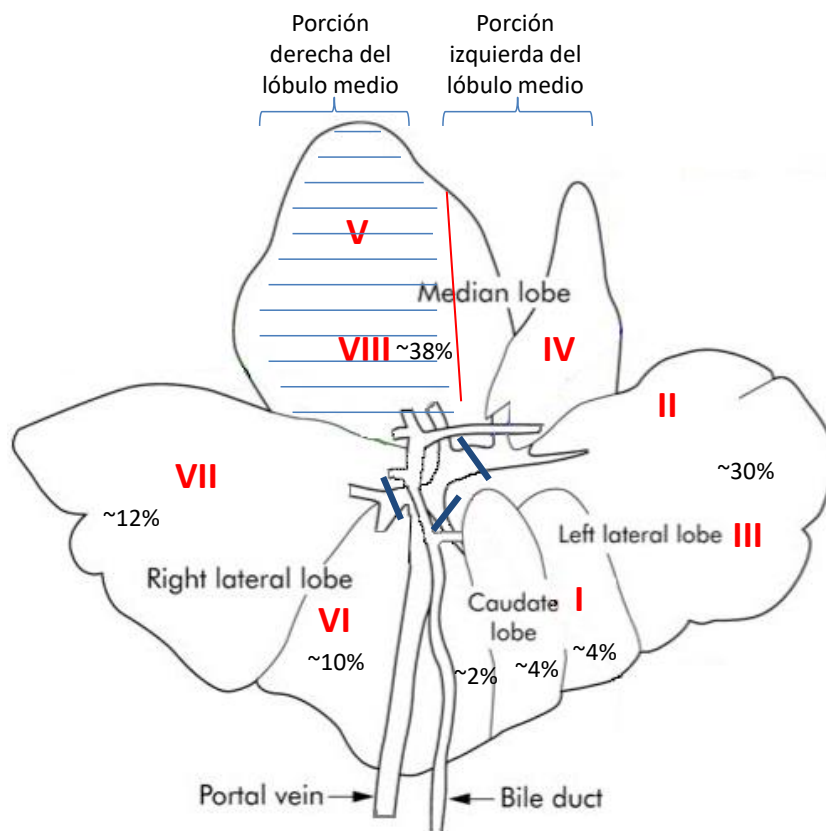
#### 1. Diseño experimental y protocolo de estudio quirúrgico

En un modelo animal se reprodujo los principios quirúrgicos implicados en la cirugía de ALPPS efectuado en humanos, estandarizándose un procedimiento que incluyó la ligadura portal asociada a transección del parénquima hepático, para el cual se utilizó ratas macho de la cepa Sprague Dawley (Bioterio Central, ICBM Facultad de Medicina, Universidad de Chile), con peso corporal de 200-230 g, alimentadas con dieta sólida estándar (Alimentos Champion S.A. Santiago) y agua *ad libitum*, mantenidas con temperatura ambiental controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs.

Protocolo quirúrgico: para inducción anestésica se utilizó 1 mL/kg de Zoletil 50® (Zolazepam clorhidrato 25 mg/mL, Tiletamina clorhidrato 25 mg/mL. Virbac S.A., Carros, Francia) inyectado vía intraperitoneal, seguido de mantención con anestésico inhalado compuesto por isoflurano 1,5-3% en oxígeno, hasta que no exista respuesta a estímulo doloroso y mantenga la ventilación espontánea. Ayuno prequirúrgico fue de 4-6 hrs, para evitar ocupación de estómago por restos alimenticios y optimización de campo operatorio. Se empleó protección ocular con ungüento oftálmico de cloranfenicol 1% para evitar queratitis. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo técnica aséptica sobre un calentador tipo “*slide warmer*” (Termofisher Scientific, USA) para asegurar una adecuada homeostasis de temperatura corporal con monitoreo continuo intraoperatorio.

Estudios de anatomía comparada han establecido una homología estructural entre el hígado de la rata y el del humano, donde en la rata cada uno de sus 4 lóbulos que son: lóbulo

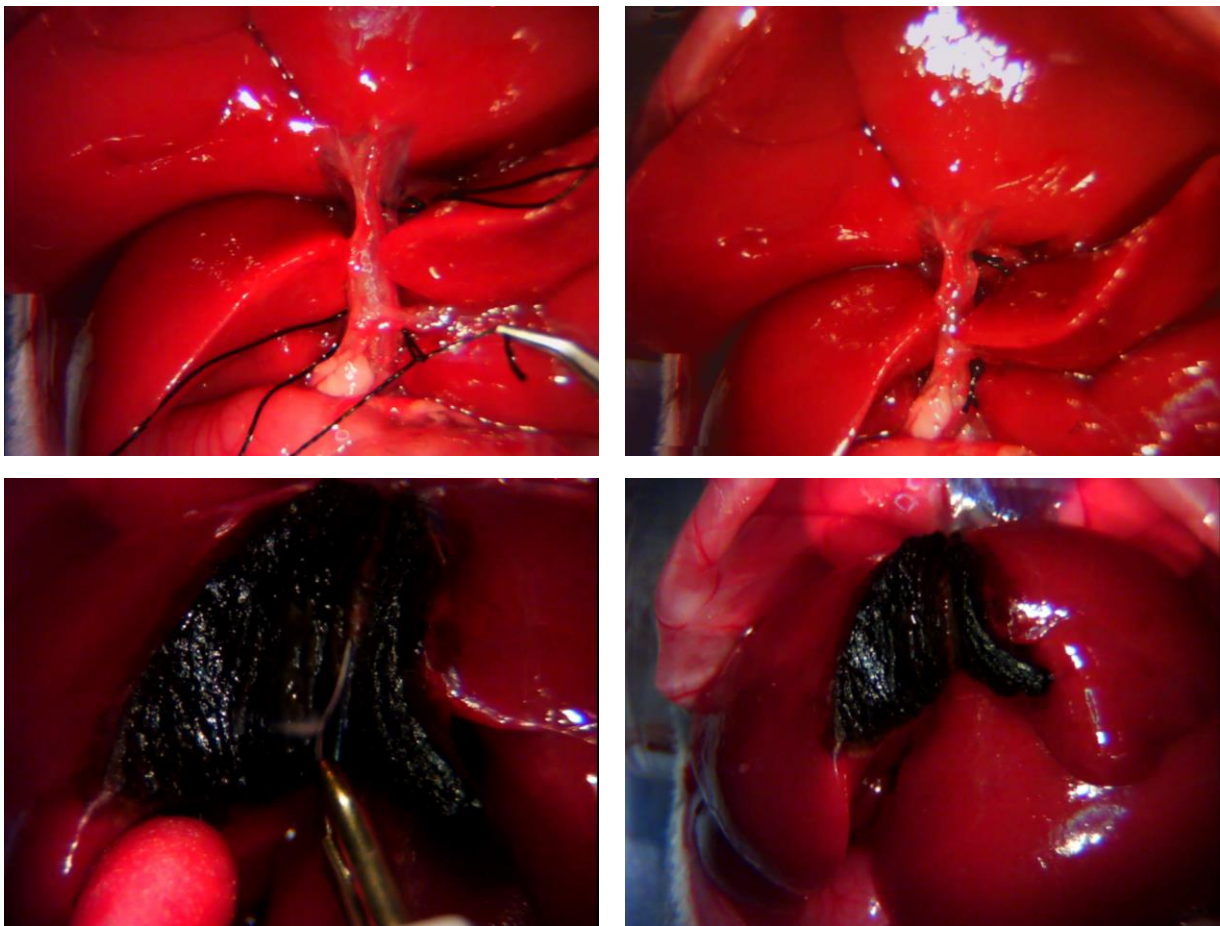
izquierdo -LI-, lóbulo medio -LM-, lóbulo derecho -LD- y el lóbulo caudado -LC-, representan consecutivamente los siguientes segmentos humanos: II-III; IV-V-VIII; VI-VII; y I [29, 125] (Figura 3). Así, siguiendo los principios de una hepatectomía que considera dejar al menos 2 segmentos adyacentes en el remanente, y asumiendo que éste debe ser insuficiente, se consideró que el tamaño del remanente debía ser 15-20% del hígado de rata, debido a que hepatectomías parciales >80% en rata se asocian a mortalidad [29, 122].



**Figura 3.** Esquema de anatomía topográfica de hígado de rata y de modelo microquirúrgico experimental de ALPPS. Se representan las relaciones porcentuales de los 4 lóbulos hepáticos y la homología estructural con los segmentos hepáticos humanos. Líneas azules cortas representan ligaduras de ramas portales. Línea roja corresponde al límite anatómico entre porción derecha e izquierda del lóbulo medio y representa la zona de transección de tejido hepático. Zona achurada con líneas paralelas indica al tejido hepático remanente.

Por consiguiente, se diseñó un procedimiento que implica ligar las ramas portales tributarias del LD y LC, al que se agrega la ligadura de la rama portal que irriga al LI junto a la porción izquierda del LM, siendo esta última porción compatible con el segmento IV en

humanos (Figura 3). De esta manera, se deja con perfusión portal, es decir, sin ligar, sólo la porción derecha del LM, que por homología se corresponde con los segmentos V y VIII en humanos, y que en términos porcentuales representa aproximadamente entre 15-20% de tejido hepático de rata. A esto se agrega una transección, que separa anatómicamente la porción derecha del LM –tejido hepático remanente no ligado- de la porción izquierda (Figura 3).



**Figura 4.** Modelo microquirúrgico experimental de ALPPS en hígado de rata. Fotos superiores, se muestra disposición de pedículo portal *in situ* con vía biliar y ramas de arteria hepática por cara anterior, junto a vena porta y sus ramas por posterior. Se observa ligaduras de ramas de vena porta del LD, LC y rama que irriga LI y porción izquierda de LM. Fotos inferiores, se muestra zona de transección hepática entre porción derecha e izquierda de lóbulo medio. Ver detalles en texto.

Bajo visión con lupa de microcirugía experimental, se efectuó el abordaje quirúrgico mediante una laparotomía subcostal bilateral, desplazándose las vísceras hacia caudal con una gasa estéril húmeda, exponiendo el pedículo hepático con la tríada portal (Figura 4). Se liberó



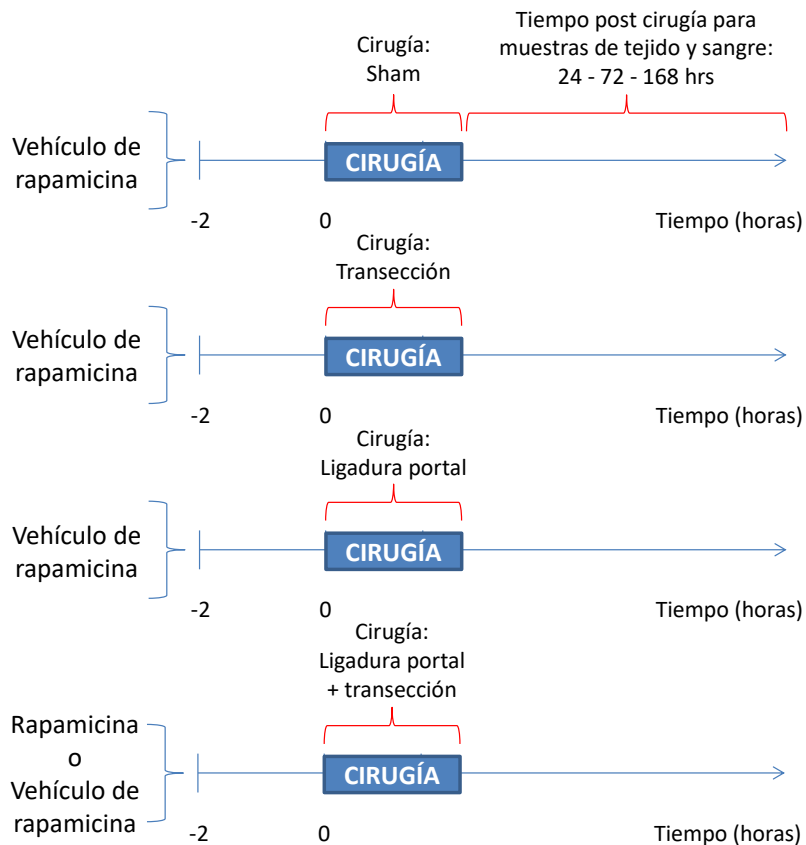
el ligamento falciforme y las reflexiones del peritoneo visceral con tijera microquirúrgica, para luego ligar las ramas portales con seda 5-0, respetando la vascularización arterial y el drenaje biliar. Tras la demarcación de una línea isquémica en el LM, luego de efectuadas las ligaduras portales, se procedió a la transección con electrocoagulador, con la precaución de no dañar el drenaje venoso hepático (Figura 4). En grupos controles se realizó la secuencia operatoria indicada, sin agregar la partición parenquimatosa o sólo realizando ésta –sin ligaduras portales-, mientras que en un último grupo de cirugía simulada –*sham*- se efectuó la laparotomía subcostal bilateral, exposición del campo operatorio, la liberación del ligamento falciforme y reflexiones peritoneales seguido de cierre de la pared abdominal, que en todos los casos se efectuó con sutura continua de pared total de seda 3-0. Así, el procedimiento indicado fue similar a la técnica reportada para el estudio de regeneración hepática en un modelo de ALPPS descrito por Yao y col. [126].

Cuidados post operatorios: se administró vía subcutánea solución NaCl 0,9% en cantidad equivalente a 1% de peso corporal en ml, inyectándose además solución analgésica intraperitoneal de Tramal® 0,01 mg/kg. Los animales se mantuvieron en recuperación en jaulas separadas en condiciones controladas de temperatura ambiental, bajo monitoreo de mecánica ventilatoria y movimientos espontáneos, con disponibilidad de agua y comida. Diariamente se evaluó el peso corporal y estado general.

Eutanasia: de acuerdo al protocolo quirúrgico experimental, bajo sedación anestésica con 60 mg/kg de nembutal 0,5% vía intraperitoneal, se tomaron muestras de sangre por punción de vena cava abdominal y de vena porta, cuyo suero recolectado tras centrifugación, se almacenó a -20°C. Una vez resecados, el remanente hepático y el resto del hígado fueron pesados por separado, tomándose muestras que se conservaron en formalina 10% para análisis

histológicos; mientras que el resto del tejido fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras determinaciones.

Tratamientos y grupos experimentales: grupos de ratas sometidas a modelo de ALPPS se trataron previo a protocolo quirúrgico con Rapamune® (rapamicina, Wyeth) con el fin de inhibir la activación de mTOR, administrándose vía intraperitoneal  $0,4\text{ mg/kg}$  en  $250\text{ }\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido 2 hrs previo a cirugía, y diariamente hasta el sacrificio como ha sido reportado [127]. Para el resto de las situaciones experimentales, los grupos de ratas operadas recibieron sólo el vehículo de Rapamune® ( $250\text{ }\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido-), siendo cada grupo sacrificado a distintos tiempos post operatorios (Figura 5).



**Figura 5.** Diseño experimental y grupos de estudio de animales de acuerdo a protocolo operatorio. Los grupos de animales sometidos a cirugía simulada *-sham-*, sólo a transección hepática o ligadura portal, fueron tratados con vehículo de rapamicina según lo descrito en texto. Los grupos de animales del modelo de ALPPS se trataron con rapamicina o su vehículo. Cada grupo sometido a eutanasia en los tiempos indicados estuvo constituido por  $n=6$ .

Todos los procedimientos y protocolos experimentales en animales se realizaron en este proyecto de acuerdo con la Guía de Cuidados y de Manejo de Animales de Laboratorio local y cuentan con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para el proyecto FONDECYT N°1130274, con resolución de aprobación N° CBAH0558FMUCH.

2. Medición de ganancia volumétrica del remanente hepático: en los animales, el peso hepático de la porción derecha del lóbulo medio –remanente hepático- fue pesado en ratas Sprague Dawley (n=6) de peso corporal similar al de los grupos de estudio (200-230 g), lo cual representó una estimación del peso del remanente previo a tratamientos quirúrgicos. Luego, se midió la tasa de regeneración hepática, según la siguiente fórmula: Tasa de regeneración =  $[(P2-P1)/P1] \times 100$ , utilizada por Yao y col. [126]. Donde P1 corresponde al peso estimado inicial de la porción derecha del lóbulo medio, mientras que P2 al peso de la porción derecha del lóbulo medio de las ratas sacrificadas según protocolo de estudio. Se calculó además, la relación entre el peso del remanente y el peso total de los hígados resecados (PR/PH), y entre el peso de remanente y el peso corporal total de la rata (PR/PT) en los momentos del sacrificio.

3. Análisis de función hepática: en suero de ratas sometidas a protocolo experimental se efectuaron mediciones de aspartato aminotransferasa (AST/GOT) y alanina aminotransferasa (ALT/GPT) mediante kits comercialmente disponibles (Valtek Diagnostics, Santiago, Chile) que fueron expresados en U/L. Además, se midió albúmina y tiempo de protrombina-INR mediante kits comerciales (Abcam Cambridge, USA) y (Wiener Lab, Argentina) expresados en mg/dL; y en porcentaje de protrombina y/o INR –*international*

*normalized ratio*- respectivamente. En cada caso se siguieron las instrucciones del fabricante.

4. Análisis histopatológico e inmunohistoquímica: las muestras de tejido hepático fijadas en formalina se incluyeron en parafina, para luego ser cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina (HE). Mediante microscopía óptica se evaluó cualitativamente la arquitectura tisular hepática, necrosis, inflamación y grado de esteatosis hepática. Secciones de tejido fueron desparafinadas e incubadas con inmunotinción para mieloperoxidasa (Abcam Cambridge, USA). La esteatosis hepática y el infiltrado inflamatorio fueron graduadas como ausente, leve, moderado o severo. Se cuantificó células mitóticas en 10 campos en forma aleatoria, estimándose un índice mitótico. Muestras de tejido fueron teñidas con ácido peryódico Schiff (PAS) y se estimó en forma semicuantitativa el contenido de glicógeno hepático mediante la cuantificación del área con tinción PAS positiva en 20 campos de mayor aumento, utilizando el software ImageJ®. Todos los análisis histológicos fueron realizados en forma ciega con respecto a los grupos experimentales.

5. Marcadores de proliferación celular: secciones de tejido fueron desparafinadas e incubadas con anticuerpo anti Ki-67 (Dako CA, USA), cuantificándose manualmente en 20 campos de mayor aumento en forma aleatoria núcleos de células con inmunotinción positiva para estimar índice de proliferación celular.

6. Marcadores serológicos: en muestras de suero se cuantificaron marcadores de progresión de regeneración hepática mediante kit de ELISA de rata disponibles para TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  (Novex®, Life Technologies, USA), EGF (Thermo Scientific™ Life Technologies, USA) y HGF (Abcam, Cambridge) medidos en  $\mu\text{g/mL}$ . Todos los análisis se efectuaron de acuerdo a instrucciones de los fabricantes. Se cuantificó nivel de glicemia

(mg/dL) mediante kit enzimático (Wiener Lab, Argentina), junto a ácidos grasos libres plasmáticos ( $\mu\text{M}$ ) con kit comercialmente disponible para rata (Abcam, Cambridge).

7. Análisis de ácidos grasos hepatocelular: el contenido total de lípidos fue extraído de homogenizados de tejido hepático utilizando el procedimiento de extracción de Bligh y Dyer modificado [128]. Para la cuantificación del contenido de ácidos grasos hepático, muestras de hígado fueron homogenizadas en agua destilada y el componente lipídico fue extraído con una solución de cloroformo/metanol en relación 1:2, seguido de centrifugación (2000 G durante 10 minutos a temperatura ambiente). Después de la extracción de la fase clorofórmica el solvente se dejó evaporar y las muestras se pesaron, estableciéndose la fracción de contenido total de lípidos del fragmento de tejido hepático analizado [128].

8. Estudios de reacción de polimerasa en cadena cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR): el contenido total de mRNA fue extraído a partir de muestras de tejido hepático con un kit comercial (EZNA® Tissue RNA kit, Omega Bio-Tek, USA) utilizando las instrucciones del fabricante. El contenido total de RNA extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría (relación A260/A280 nm) cuya pureza e integridad fue confirmada. A continuación, se sintetizó cDNA mediante el uso del sistema enzimático Super Script II® (Invitrogen Life Technologies Inc., CA, USA) con hexanucleótidos como *random primers* (Promega Random Primer). El cDNA, fue amplificado por qRT-PCR, utilizando SYBR Green I Master (Roche) en un termociclador Light Cycler 480 (Roche) con partidores específicos para genes IL-6, HGF, mTOR, S6K1, TSC1, TSC2, Akt y la subunidad  $\alpha$  de AMPK, que se normalizaron para expresión de RPS-23 (Tabla 1). Los niveles de expresión de mRNA fueron cuantificados por el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Los resultados se expresaron como veces de cambio con respecto al grupo control *-sham-*.

Gen	Forward	Reverse
Rn IL-6	TAC CCC AAC TTC CAA TGC TC	TGA GTT GGA TGG TCT TGG TC
Rn HGF	GGG GAA TGA GAA ATG CAG TC	AGC CCC AGC ACA TAA TTC AG
Rn mTOR	AGG AAG GAC GTT TGC TCA GA	TCC CTC ACT GAA CAC AGC AG
Rn S6K1	TTA TTG GTA GCC CAC GAA CG	TGT CTG AGG ATT TGC TGT GC
Rn TSC1	AAG AAA CCA GGC CAT GTG AC	CAT AAA GGC GAT GGA AGA GG
Rn TSC2	TGC CGT ATC ATG GAG AAC AG	GCC ATC CCA ACA AAG AAC AC
Rn AKT	TCT CAG TGG CAC AAT GTC AG	AGC GGA TGA TGA AGG TGT TG
Rn AMPK	TTT GCC TAG AAT CCC CAC AG	TAA GGA GCC CAG AAA ACA GC
Rn RPS-23	GTA GGG GTT GAA GCC AAA CA	CAC CTT AAA GCG GAC TCC AG
Hs IL-6	CCT GAA CCT TCC AAA GAT GG	TTT TCA CCA GGC AAG TCT CC
Hs TNF- $\alpha$	AAG AGA ATT GGG GGC TTA GG	GAA TCC CAG GTT TCG AAG TG
Hs HGF	ATC AAA TGT CAG CCC TGG AG	TTC TTC CCC TCG AGG ATT TC
Hs TGF $\beta$ 1	ATT GAG GGC TTT CGC CTT AG	AAC CCG TTG ATG TCC ACT TG
Hs mTOR	TGT CCT GCT GGT CTG AAC TG	TTC AGC GAT GTC TTG TGA GG
Hs S6K1	GCA CAG CAA ATC CTC AGA CA	GAT GCT TCC CCA CTC ATT GT
Hs 4E-BP1	TCT GGT TTC AGG TCT CGA TG	ATT TCC TCT CTT GGG GAA GG
Hs TSC1	TTC GAC ACG GCT GAT AAC TG	ATC AGG TGG GAC ATT TCC AG
Hs TSC2	TGC TCA TCA ACA GGC AGT TC	TCT TTA TCC TCG GGG ATG TG
Hs AKT	TCT ATG GCG CTG AGA TTG TG	TTG TCC AGC ATG AGG TTC TC
Hs AMPK	ATG GAC GGG TTG AAG AGA TG	TCT GGT TTC AGG TCT CGA TG
Hs CD1	TGG TGA ACA AGC TCA AGT GG	CTG GCA TTT TGG AGA GGA AG
Hs $\beta$ -actin	GCT CTT TTC CAG CCT TCC TT	GCA CTG TGT TGG CAT ACA GG

**Tabla 1.** Partidores específicos de genes de ratas (Rn) y humanos (Hs) para ensayos de qRT-PCR. Las secuencias son mostradas en sentido 5'→3'.

9. Western blot: extractos de proteínas totales se obtuvieron de acuerdo a la técnica descrita por Deryckere y Gannon [129], homogenizando muestras de tejido hepático [amortiguador A: Hepes 10 mM pH 7,9, Nonidet P-40 al 0,6%, NaCl 150 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,5 mM, inhibidores de proteasas (aprotinina y leupeptina) 1 $\mu$ g/mL e inhibidores de fosfatasa 1 mM], seguido de centrifugación (600 G), incubación (4°C) y centrifugación del sobrenadante (2300 G), siendo el sobrenadante el extracto de proteínas totales, el cual se almacenó a -80°C. Se sometieron 10  $\mu$ L de extractos totales de proteínas hepáticas (50  $\mu$ g de proteínas) a electroforesis en geles de acrilamida (PAGE-SDS) con gel concentrador [H<sub>2</sub>O, Tris-HCl pH 6,8, acrilamida/bisacrilamida 30/0,8%, persulfato de amonio 1% y TEMED] y gel separador al 10% [H<sub>2</sub>O, Tris-HCl pH 8,8, acrilamida/bisacrilamida 30/0,8%, persulfato de amonio, TEMED], utilizando amortiguador de corrida [Tris base 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1%]. Al término de la electroforesis,

las proteínas ya separadas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un sistema húmedo, con amortiguador de transferencia [Tris base 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8,3]. Luego, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 5% en TBS [Tris 0,1 M, NaCl 1 M, pH 7,5]. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 20 al 0,1%, e incubadas con anticuerpos primarios contra mTOR y la fosforilación de mTOR, utilizando como control de carga interno  $\alpha$ -tubulina. Para la detección de las proteínas se utilizó un sistema quimioluminiscente (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) con una solución luminol/enhancer y solución de peróxido estable en una relación 1:1. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa UN-SCAN-IT GEL (Gel & Graph Digitizing Software, versión 6.1, Silk Scientific Corporation 1988-2005, Utah, USA). Los resultados se expresaron en unidades densitométricas arbitrarias como veces de cambio con respecto al grupo control *-sham-*.

10. Análisis estadísticos: el tamaño muestral se determinó mediante la siguiente fórmula,  $n=[2(Z_a+Z_b)^2 \times S^2]/d^2$ ; los valores considerados para los coeficientes de riesgo  $Z_a$  y  $Z_b$  fueron de 1,645 y 0,842 (riesgo de 0,05), respectivamente. La variabilidad en el grupo control utilizada para el cálculo es de 100 (cél/campo visual) y se estimó a partir del número de células positivas para Ki-67 en modelo de regeneración con ligadura portal de 80% del tejido hepático previamente publicado [130]. Así, asumiendo una diferencia deseada de 140 (cél/campo visual) con el modelo de ALPPS propuesto, según la fórmula, para encontrar diferencias significativas entre lo propuesto y sus controles, el número (n) ideal es de 6,31; por lo que se estudiaron 6 ratas por grupo experimental.

Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  desviación estándar (DE) en texto y error estándar de la media en gráficas. Para las comparaciones entre los grupos se aplicó

análisis de varianza (one-way ANOVA). Se evaluó la normalidad y la homocedasticidad de los datos, demostrándose diferencias significativas entre variables mediante análisis post hoc con test de Newmann Keuls para múltiples comparaciones. Los análisis se efectuaron con el software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Diferencias de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas.

## 5.2 Estudios en humanos

### 1. Tipo, población y lugar de estudio

Complementariamente se efectuó un estudio observacional, descriptivo de terapia, en una serie de casos prospectiva constituida por pacientes sometidos a ALPPS por el equipo de Cirugía Hepatobiliar del Hospital del Salvador. Así, la población de estudio estuvo conformada por pacientes adultos hombres o mujeres, mayor o igual a 18 años con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal sometidos o no previamente a quimiorradioterapia, que requieren hepatectomías extendidas, y en que se estima un volumen de remanente hepático insuficiente. Los casos fueron reclutados en forma consecutiva, a partir de pacientes evaluados en el policlínico de cirugía y oncología del Hospital del Salvador, así como del comité oncológico multidisciplinario de dicha institución, por lo que se obtuvieron de la población adscrita al Servicio de Salud Metropolitano Oriente que se atiende en el Hospital del Salvador, Santiago-Chile, durante el periodo 2013-2015 (Figura 6).

### 2. Criterios de inclusión y de exclusión

#### *Criterios de inclusión*

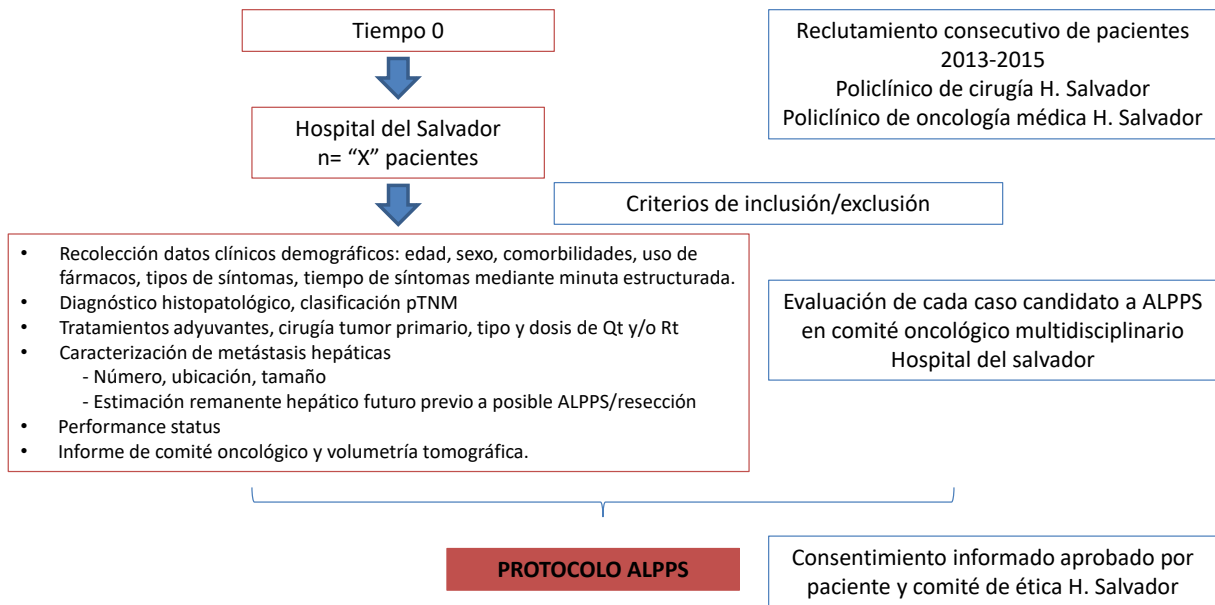
- Adultos, mayor o igual a 18 años con cáncer colorrectal confirmado por histopatología con o sin quimiorradioterapia previa.



- Pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal con primario controlado, ya sea con o sin tratamiento quirúrgico del tumor primario y/o terapias adyuvantes.
- Metástasis hepáticas no resecables mediante hepatectomía en un tiempo por siguientes razones: ubicación anatómica difícil, dificultades técnicas, diseminación intrahepática multinodular bilobular, bajo o muy bajo remanente hepático futuro estimado previo a tratamiento quirúrgico resectivo, definido como  $\leq 20\%$  en hígado sano, 30-40% en hígado con quimioterapia previa, 50% en hígado cirrótico.
- Estudio de diseminación negativo para enfermedad extrahepática.
- Aprobación por comité oncológico multidisciplinario del Hospital del Salvador.
- Consentimiento informado aprobado por comité de ética del Hospital del Salvador.

#### *Criterios de exclusión*

- Compromiso hepático por tumores hepáticos primarios o metastásicos no colorrectales (criterio de exclusión relativo).
- Estudio de diseminación positivo para enfermedad extrahepática.
- Enfermedad primaria hepática conocida –daño hepático crónico- diagnosticado previo a cirugía o durante intraoperatorio. Se excluyeron pacientes cirróticos por constituir un grupo de muy alto riesgo, en el contexto de una cirugía compleja en fase de estandarización. Por lo demás, el daño hepático crónico presenta propiedades particulares en los fenómenos de regeneración hepática que difieren de los observados en hígados sin esta condición [131].



**Figura 6.** Maniobra del estudio clínico de pacientes candidatos a tratamiento quirúrgico mediante protocolo ALPPS. Ver en texto criterios de inclusión/exclusión.

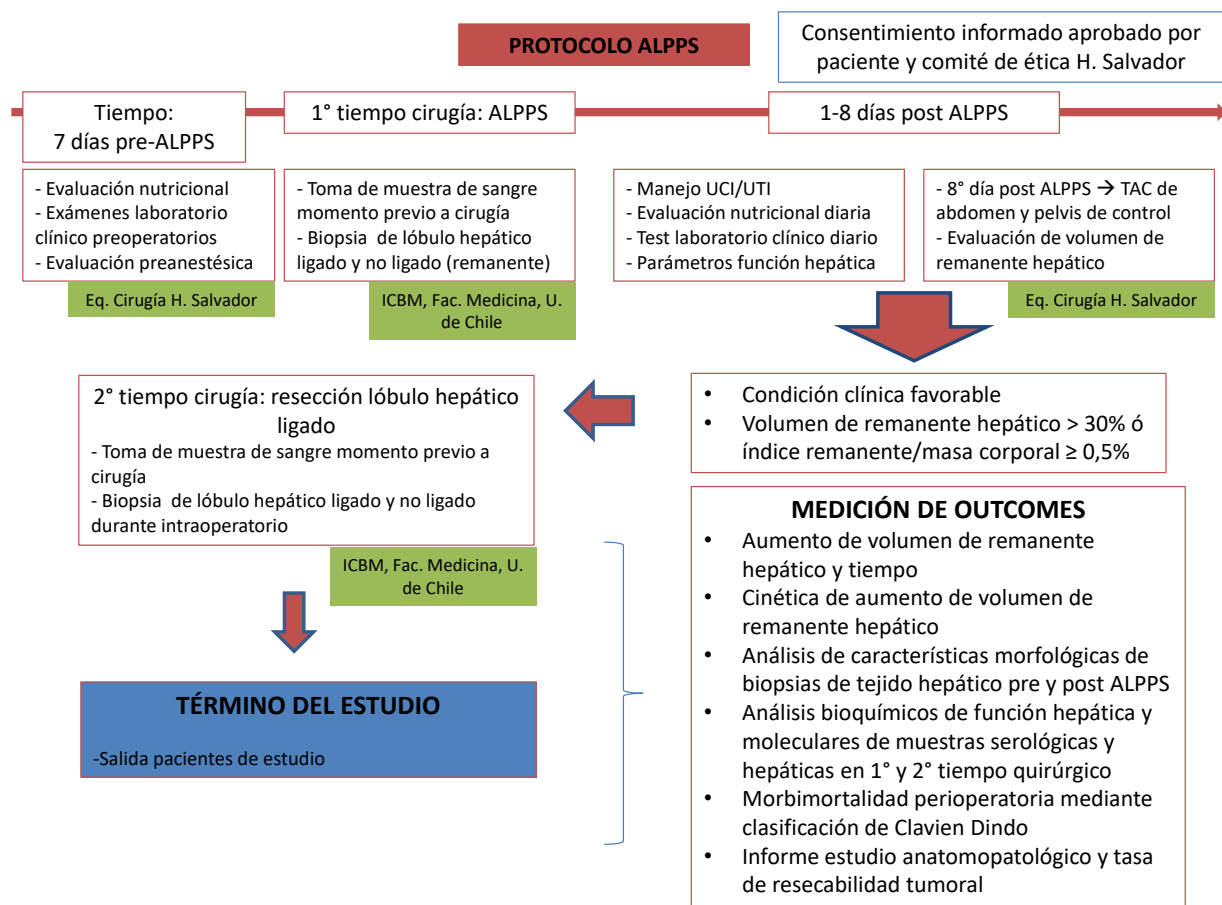
3. Técnica quirúrgica de ALPPS y protocolo de estudio: efectuada la evaluación clínica inicial, con aprobación de la cirugía ALPPS por el comité oncológico multidisciplinario del Hospital del Salvador, se ingresó el paciente al protocolo de estudio ALPPS (Figura 7). Todos los pacientes ingresados a este estudio, lo hicieron previo consentimiento informado firmado y aprobado por el comité de ética del Hospital del Salvador en el contexto del proyecto FONDECYT N°1130274 dentro del cual se enmarcó este estudio (Anexo 1).

En relación a la técnica quirúrgica, como se detalló con antelación y siguiendo los principios descritos por Álvarez y col. [50], el paciente se ubica en posición decúbito supino, abordándose por laparotomía subcostal derecha ampliada. Abierto peritoneo, se accede a cavidad abdominal, realizándose exploración visual y digital de lesiones hepáticas para pesquisa de eventuales lesiones a distancia. Se complementa evaluación con estudio ecográfico intraoperatorio para caracterización de lesiones metastásicas intrahepáticas. Se identifica vesícula biliar, disecándose estructuras de hilio vesicular. Ligadura de conducto y

arteria cística con poliglactina 3-0 (Vicryl™), extirpándose vesícula biliar de lecho hepático con electrobisturí. Se identifica pedículo hepático, disecándose rama derecha de vena porta que se secciona con stapler vascular, o en su defecto, con doble ligadura de seda 2-0 y sección con bisturí frío, respetándose vascularización arterial y drenaje biliar. Tras delimitación del área isquémica del lóbulo hepático derecho ya deportalizado, se realiza transección parenquimatosa con electrocoagulador y/o dispositivo de energía (Harmonic® o Aquamantys™), ligándose colaterales intrahepáticas con seda 3-0 en relación a fisura umbilical, separando anatómicamente los segmentos II-III del IV. En caso de objetivarse lesiones metastásicas en segmentos II-III remanentes, se trataron mediante resección, ablación por radiofrecuencia o alcoholización según condiciones locales (Figura 1). Finalmente, se completa liberación de ligamentos del lóbulo hepático derecho hasta lograr completa movilización de éste, el que se envuelve con material estéril de hule para evitar adherencias post quirúrgicas. Se instalan drenajes de látex hacia lecho hepático de disección que se fijan a piel con seda 2-0. Cierre de laparotomía por planos con poliglactina 1-0 continuo para aponeurosis, poliglactina 3-0 continuo para tejido subcutáneo y piel con sutura mecánica.

Tras el primer tiempo quirúrgico, el paciente se manejó en la unidad de cuidados intensivos donde se realizaron evaluaciones quirúrgicas y nutricionales diarias, junto a seguimiento de laboratorio clínico habitual y control de parámetros de función hepática seriados. Al 8° ó 9° día post operatorio, según condición clínica del paciente, se efectuó control imagenológico con tomografía computada de abdomen y pelvis con contraste endovenoso, con el objetivo de cuantificar los cambios volumétricos del remanente hepático, según el cual se decidió momento del tiempo resectivo. Si paciente presenta favorable condición clínica general, sin signos de complicación médico-quirúrgica en curso post

operatorio que contraindique cirugía, o que en su defecto implique la necesidad de reexploración quirúrgica previo a control imagenológico señalado; y junto a un volumen de remanente hepático suficiente  $>30\%$  o índice remanente hepático/masa corporal  $\geq 0,5\%$ , se efectuó segundo tiempo operatorio resectivo (Figura 7). En tal caso, se aborda lecho operatorio a través de la misma incisión de cirugía previa tras retiro de suturas de pared abdominal. Se efectúa exploración de cavidad, retirándose drenajes y bolsa instalada previamente. Se disecan y ligan arteria hepática derecha con seda 2-0, mientras que conducto biliar hepático derecho con Vicryl™ 3-0, seccionándose ambas estructuras con bisturí frío. Se liberan adherencias post quirúrgicas hasta abordar vena suprahepática derecha y media las que se seccionan con stapler vascular, según técnica previamente publicada [50] (Figura 1).



**Figura 7.** Protocolo de estudio clínico de pacientes sometidos a ALPPS.

En momentos previos a primer tiempo quirúrgico –ALPPS- y a segundo tiempo operatorio resectivo, se tomaron muestras de sangre venosa, cuyo plasma se separó por centrifugación y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Además, se obtuvo una muestra de tejido hepático equivalente a  $1\text{ cm}^3$  tanto del lóbulo derecho –con carga tumoral y previo a ligadura de vena porta respectiva-, y del remanente hepático –segmentos II y III-; de los cuales una porción de la muestra se conservó en formalina 10% para estudios histopatológicos, mientras que el resto se segmentó en pequeños trozos que se almacenaron en RNA later® Stabilization Solution (Life Technologies USA), medio que permite conservar el RNA celular para determinaciones posteriores.

4. Medición de ganancia volumétrica del remanente hepático: según el protocolo de estudio ALPPS (Figura 7) se efectuó una medición cuantitativa absoluta del volumen (mL) y se relacionó tanto al volumen hepático total –volumen del remanente hepático futuro estandarizado- cuya medida es expresada en porcentaje, así como a la masa corporal total del paciente –volumen del remanente/peso corporal total-, el cual también se mide en porcentaje, siendo considerado insuficiente si su valor es  $<0,5\%$  [24]. Esta última medición, se obtiene al considerar que el volumen del remanente hepático (mL), es equivalente a su peso expresado en gramos, debido a que la densidad de este tejido es aproximadamente 1, como ha sido reportado previamente [132]. Tales mediciones se efectuaron con el software OsiriX®, registrándose el tiempo en que se realizó la volumetría post primera cirugía de ALPPS –etapa I de ALPPS-, a partir del cual se determinó el cambio volumétrico diario del remanente (mL/día).

5. Análisis de laboratorio clínico y función hepática: se realizó una evaluación seriada de las pruebas de función hepática obtenidas por el laboratorio clínico del Hospital del

Salvador, a través de perfil hepático que incluye bilirrubina total y bilirrubina directa (mg/dL), junto a fosfatasas alcalinas, gamma glutamil transpeptidasa, aspartato aminotransferasa (AST/GOT) y alanina aminotransferasa (ALT/GPT) medidas en U/L. Se registraron las pruebas de coagulación mediante tiempo de protrombina (%) y expresado en su forma estandarizada por INR. Se midió albumina (g/dL) sérica con kit diagnóstico (Wiener Lab, Argentina) según instrucciones del fabricante.

6. Análisis histopatológico e inmunohistoquímica: muestras de tejido hepático humano fijadas en formalina 10% se incluyeron en parafina, para luego ser cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina (HE). Mediante microscopía óptica se evaluó la arquitectura tisular, necrosis, inflamación y grado de esteatosis hepática de igual manera a la técnica descrita previamente para los estudios en ratas. Se cuantificó células mitóticas en 10 campos en forma aleatoria, estimándose un índice mitótico. Adicionalmente, secciones de tejido fueron desparafinadas e incubadas con anticuerpo anti Ki-67 (Dako CA USA), cuantificándose en 20 campos en forma aleatoria, núcleo de hepatocitos con inmunotinción positiva para estimar índice mitótico mediante un marcador de proliferación celular. La evaluación histológica fue realizada en forma ciega respecto al lóbulo hepático del cual procede la muestra.

7. Marcadores serológicos: en muestras de suero humano se cuantificaron marcadores de progresión de regeneración hepática mediante kit de ELISA humano comercialmente disponibles para TNF- $\alpha$ , IL-6, HGF, TGF- $\beta$  y EGF medidos en  $\rho\text{g/mL}$  (Novex®, Life Technologies, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8. Estudios de reacción de polimerasa en cadena cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR): en muestras humanas de tejido hepático se empleó la técnica de qRT-PCR de igual forma a la descrita previamente. Se utilizaron partidores específicos para los genes IL-6, TNF-

$\alpha$ , HGF, TGF- $\beta$ , mTOR, S6K1, 4E-BP1, TSC1, TSC2, Akt, subunidad  $\alpha$  de AMPK, y ciclina D1 humano, los que se normalizaron para expresión de  $\beta$ -actina, representados en unidades relativas (Tabla 1).

9. Descripción clínica y demográfica de pacientes: se realizó una caracterización clínica de los pacientes sometidos a ALPPS, incluyendo en un registro estructurado las siguientes variables: edad (años), comorbilidades, estado nutricional de pacientes e índice de masa corporal, fármacos, terapias adyuvantes (tipo y dosis de quimiorradioterapia) y hábito tabáquico, considerando que estas variables pueden modificar los resultados primarios clínicos –ganancia volumétrica del remanente- y moleculares –inducción de vía AMPK/mTOR-, mientras que pueden alterar la capacidad de regeneración hepática. Así también, se registró el número, ubicación y tamaño de las metástasis hepáticas, pues representan factores confusores, debido a que influyen tanto en el plan quirúrgico realizado –localización de la ligadura portal, ubicación y magnitud de la transección hepática, junto a tratamientos adicionales para las metástasis en el remanente-, así como posiblemente en los niveles de aumento de volumen logrado dependiendo del tamaño del remanente post ALPPS. Adicionalmente, se evaluaron otras variables como género, diagnóstico histopatológico de tumor colorrectal y etapa clínica del cáncer, *performance status*, tipos de cirugías previas y marcadores tumorales de utilidad clínica (antígeno carcinoembrionario, alfafetoproteína y/o Ca19-9). Todas las variables fueron incorporadas a una base de datos Excel, Microsoft Office 2010®.

10. Morbilidad y mortalidad post ALPPS: los resultados clínicos de los pacientes sometidos a ALPPS fueron evaluados según la clasificación estandarizada de Clavien Dindo para morbimortalidad perioperatoria [67]. Se estudió la incidencia de insuficiencia hepática post operatoria mediante los criterios “50-50” validados para este fin [27], y en caso de ocurrir,

se estadió la gravedad de la insuficiencia hepática post operatoria mediante los criterios establecidos por *International Study Group of Liver Surgery* [26]. Se analizó el resultado patológico de la pieza operatoria, de cuyos informes se estableció el compromiso tumoral de los márgenes quirúrgicos (R0, R1 o R2) y la tasa de reseccabilidad de los pacientes operados mediante ALPPS. Se determinó la sobrevida general de los pacientes mediante curvas de Kaplan-Meier.

11. Análisis estadísticos: en el contexto de un estudio observacional, de tipo descriptivo de una nueva terapia clínica aplicada a una serie de casos prospectiva como el propuesto, se consideró para el cálculo del tamaño muestral, una hipótesis referida al resultado clínico principal que se desea obtener con este tratamiento quirúrgico, es decir, el aumento de volumen a niveles suficientes para la resección hepática segura. Así, asumiendo que en los pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal y con volumen de tejido hepático remanente futuro insuficiente post hepatectomía extendida, el ALPPS determina una ganancia de volumen en el remanente hepático de al menos un 70% en un periodo de 8 días (H1), siendo la hipótesis nula lo contrario (H0); a través del uso del software estadístico Granmo Versión 7.11, año 2011, se efectuó el cálculo de tamaño muestral para medidas de proporciones pareadas –repetidas en un grupo–, aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste unilateral. De esta manera, se necesitan 11 pacientes asumiendo que la proporción inicial de acontecimientos es de 0 y al final de la intervención 0.7 (70% ganancia de volumen del remanente hepático), y a su vez, que la tasa de pérdida de seguimiento es 0%. Es decir, para poder comprobar –o rechazar– la hipótesis referida a la ganancia volumétrica, se requiere 11 sujetos de estudio sometidos a esta intervención. A su vez, el diseño muestral que se utilizó en este trabajo corresponde a un muestreo no



probabilístico, seleccionando casos en forma consecutiva conforme se cumplieran los criterios de inclusión planteados previamente, hasta alcanzado el tamaño muestral estimado.

Ante las características del diseño de este estudio en humanos, fue posible dada la naturaleza pareada de algunas variables estudiadas, particularmente referidas a la ganancia de volumen y a las mediciones morfológicas y/o bioquímicas planteadas en 2 tiempos claramente definidos, previo y post ALPPS, efectuar comparaciones que permitan determinar diferencias con significancia estadística, ante lo cual se aplicaron pruebas estadísticas conforme el tipo de variable implicada y su distribución, mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). De esta manera, se analizaron diferencias estadísticas para los niveles de ganancia de volumen del remanente hepático, así como variables morfológicas y marcadores moleculares, medidos previo y post ALPPS, mediante pruebas estadísticas según su distribución normal (T Student) o no normal (test de Wilcoxon), considerando significancia estadística  $p < 0,05$ . En el grupo de pacientes enrolados se evaluaron las variables confusoras y modificadoras de efecto mediante estadística descriptiva.

Todos estos análisis fueron efectuados con el fin de determinar los cambios biológicos inducidos por el procedimiento quirúrgico en estudio –ALPPS-, tanto desde el punto de vista volumétrico, así como los cambios morfológicos y algunos aspectos de los procesos fisiológicos subyacentes en este contexto clínico. De manera que la evaluación clínica de este estudio no ha sido diseñada para evaluar ni establecer medidas de asociación, debido a la naturaleza descriptiva y observacional del mismo cuyo objetivo es estandarizar y evaluar una técnica quirúrgica de reciente introducción desde una mirada fisiológica.

## VI. Resultados

### 6.1 Estudios en modelo animal de ALPPS

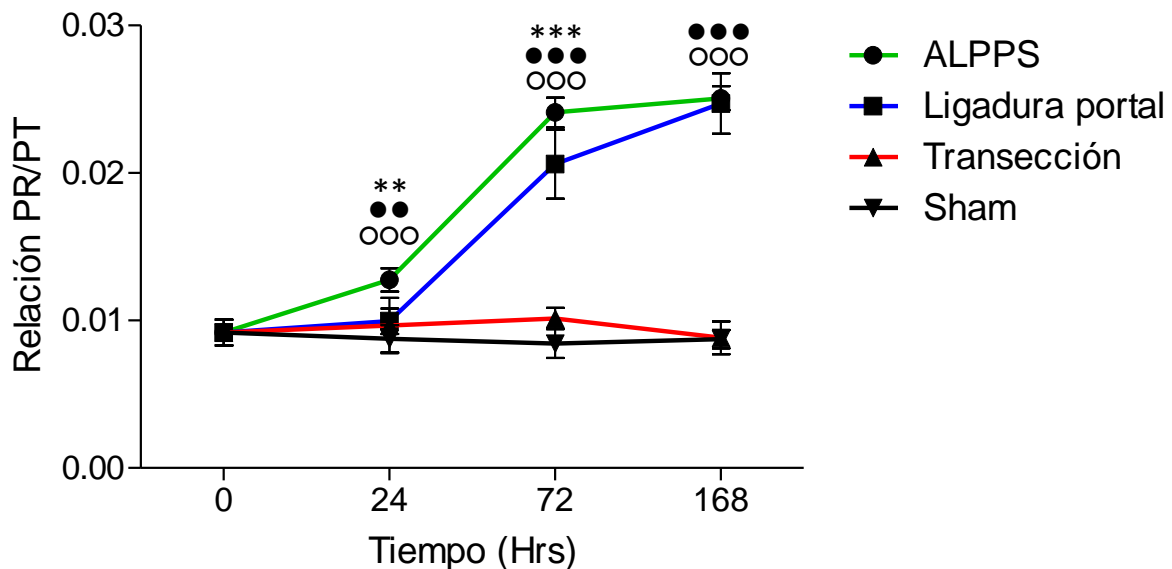
#### 1. Estandarización de modelo de ALPPS e incremento de volumen de remanente hepático

En ratas de la cepa Sprague Dawley se logró estandarizar un modelo quirúrgico de ALPPS, que tal como fue descrito previamente, implica la realización de ligaduras de las ramas portales tributarias del lóbulo derecho y lóbulo caudado, junto a la rama portal que irriga el lóbulo izquierdo y la porción izquierda del lóbulo medio. Adicionalmente, se efectuó la transección del parénquima hepático, separando anatómicamente la porción derecha del lóbulo medio –que corresponde al tejido hepático remanente no ligado- de la porción izquierda, mientras que fue posible establecer los grupos quirúrgicos controles de ligadura portal, transección y cirugía simulada *sham*, tal como fue planificado.

Se intervino un total de n=102 ratas que se asignaron a los grupos quirúrgicos antes señalados, cada uno constituido por n=5 ó 6 ratas, en 3 tiempos de eutanasia distintos (24 hrs, 72 hrs y 7 días). La mortalidad perioperatoria fue de 8,82% (n=9), siendo sus principales causas la hemorragia intraoperatoria –secundario a lesión vascular en relación a variantes anatómicas como ramas portales intrahepáticas, disección difícil o durante la transección- (n=7); así como a reacciones adversas a fármacos anestésicos de tipo idiosincrática (n=1) o por exceso con depresión cardiorrespiratoria secundaria (n=1). Adicionalmente, algunos animales fueron excluidos del estudio (n=3) debido al desarrollo de signos clínicos de insuficiencia hepática post operatoria (n=2) y una rata con esteatosis macroscópica objetivada al momento de la cirugía. Un total de n=8 animales fueron sacrificados para la estimación cuantitativa de la

masa hepática del remanente basal y la toma de muestras serológicas sin ningún tipo de intervención quirúrgica previa.

Tras la realización de los distintos procedimientos quirúrgicos se cuantificó la ganancia de masa hepática del tejido remanente mediante la relación entre el peso de éste y el peso corporal total de la rata al momento del sacrificio (PR/PT) (Figura 8).



**Figura 8.** Cambios de la relación entre peso de remanente y peso corporal total (PR/PT) en el tiempo. Grupo ALPPS vs Ligadura portal 24, 72 y 168 hrs (\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; p >0,05 respectivamente). Grupo ALPPS vs Transección 24, 72 y 168 hrs (●● p<0,01; ●●● p<0,001; ●●● p<0,001 respectivamente). Grupo ALPPS vs Sham 24, 72 y 168 hrs (○○○ p<0,001; ○○○ p<0,001; ○○○ p<0,001 respectivamente).

Así, es posible observar un incremento progresivo de masa del remanente hepático tras la realización de ALPPS y ligadura portal, situación que no se observa en los animales sometidos a transección ni cirugía simulada, donde la relación PR/PT se mantiene sin mayores cambios. Sin embargo, a pesar que tanto en el grupo ALPPS como ligadura portal se llega a la misma relación PR/PT al cabo de 7 días, los animales sometidos al modelo quirúrgico de ALPPS presentan un incremento de masa hepática del remanente significativamente mayor

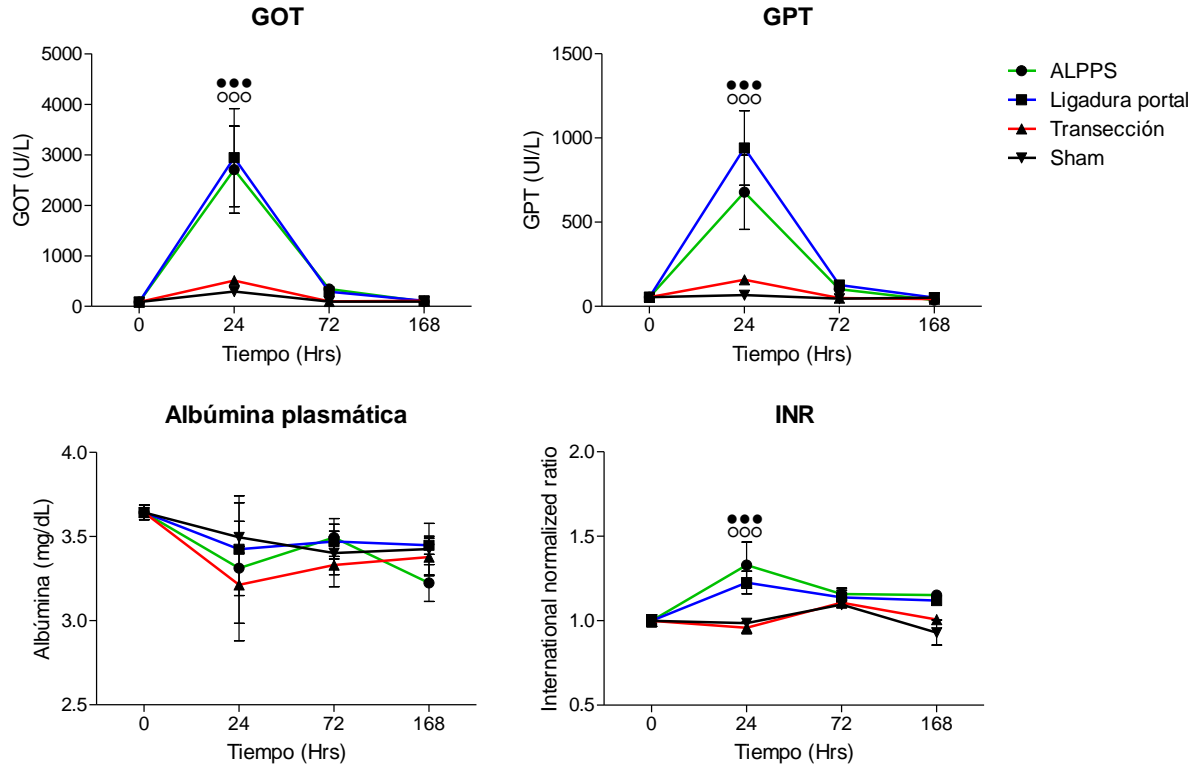
respecto al grupo ligadura portal a las 24 hrs ( $0,013 \pm 0,002$  vs  $0,01 \pm 0,0009$ ;  $p < 0,01$ ) y a las 72 hrs ( $0,024 \pm 0,0023$  vs  $0,021 \pm 0,0023$ ;  $p < 0,001$ ) respectivamente (Figura 8).

## 2. Evaluación de parámetros de función hepática

Con el fin de evaluar el comportamiento de distintos parámetros relacionados a función y/o daño hepatocelular se determinaron niveles de transaminasas (GOT/AST y GPT/ALT), pruebas de coagulación (tiempo de protrombina-INR) y albúmina sérica en los distintos grupos experimentales. Así, se advierte que tanto en los grupos ALPPS como ligadura portal existe un incremento significativo de niveles de GOT séricos alcanzando su nivel máximo a las 24 hrs ( $2705,2 \pm 2115,1$  U/L y  $2944,5 \pm 2377,7$  U/L respectivamente), luego del cual tienden a normalizarse a las 72 hrs, mientras que vuelve a niveles basales a los 7 días, sin establecerse diferencias significativas entre ambos grupos en los tiempos señalados ( $p > 0,05$ ). A su vez, si bien en el grupo sometido a transección existe un incremento transitorio de GOT sérica a las 24 hrs, éste no varía significativamente respecto al grupo control *sham* ( $512,1 \pm 23,7$  U/L vs  $294,3 \pm 46,4$  U/L;  $p > 0,05$ ), continuando cerca de niveles basales en ambos grupos (Figura 9).

En el caso de GPT sérica, se observa idéntico comportamiento al descrito previamente, identificándose un incremento máximo de sus niveles a las 24 hrs en los grupos ALPPS y ligadura portal ( $678,3 \pm 541,3$  U/L y  $941 \pm 541,8$  U/L respectivamente), normalizándose en los siguientes tiempos de estudio sin diferencias estadísticas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ), aunque con diferencias significativas respecto a los grupos transección y *sham* a las 24 hrs (Figura 9). El grupo de transección presenta un incremento transitorio de GPT sérica a las 24 hrs sin diferencias estadísticas comparado al grupo *sham* ( $157,5 \pm 7$  vs  $66,6 \pm 17,9$  U/L;  $p > 0,05$ ), manteniéndose niveles basales en el resto de los tiempos de estudio en ambos grupos

( $p > 0,05$ ) (Figura 9). Entre todos los grupos experimentales no se observan diferencias significativas en niveles de transaminasas a las 72 hrs y 7 días.



**Figura 9.** Pruebas de función y/o daño hepatocelular en el tiempo tras las intervenciones quirúrgicas en ratas. Se muestra comparaciones estadísticas entre grupo ALPPS vs controles (\* ALPPS vs Ligadura portal; ● ALPPS vs transección; ○ ALPPS vs Sham). Un símbolo indica  $p < 0,05$ ; dos símbolos  $p < 0,01$ ; tres símbolos  $p < 0,001$ .

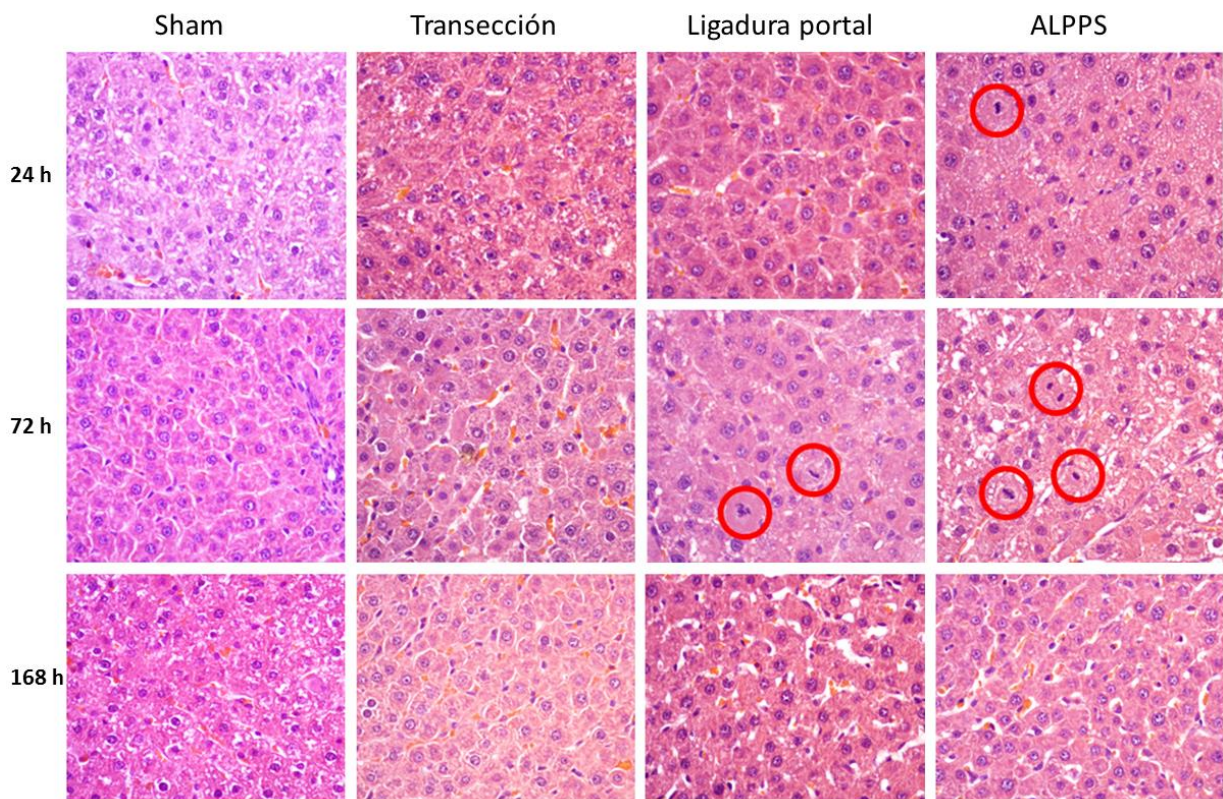
La albúmina plasmática desde un nivel basal de  $3,64 \pm 0,04$  g/dL, presentó una leve disminución en las primeras 24 hrs en todos los grupos experimentales, siendo mayor tal variación en el grupo quirúrgico de transección, que presenta diferencias significativas respecto al grupo control *sham* ( $3,21 \pm 0,2$  vs  $3,49 \pm 0,09$ ;  $p < 0,05$ ), no así comparado al resto de los grupos quirúrgicos de experimentación (Figura 9). Las ratas sometidas a modelo de ALPPS no presentan diferencias significativas en niveles de albúmina sérica respecto a ninguno de los grupos experimentales en los tiempos estudiados (Figura 9).

La función hepatocelular evaluada mediante tiempo de protrombina y expresada en su forma estandarizada INR –*international normalized ratio*-, muestra valores que tanto en los grupos de animales sometidos a transección y control *sham* no varían significativamente en los distintos tiempos estudiados (Figura 9). No obstante, tanto los grupos ALPPS como ligadura portal presentan a las 24 hrs un incremento en el INR ( $1,329 \pm 0,2$  y  $1,226 \pm 0,165$ ; respectivamente), sin diferencias entre ambos ( $p > 0,05$ ), aunque sí respecto a los grupos controles de transección y *sham* (Figura 9). Posteriormente, los valores de INR en todos los grupos experimentales se igualan a las 72 hrs y 7 días sin establecerse diferencias significativas entre ellos.

### 3. Cambios histológicos y marcadores de proliferación celular

Con el fin de evaluar desde el punto de vista microscópico los cambios de masa de tejido hepático remanente inducidos por los distintos procedimientos quirúrgicos, se efectuaron estudios histológicos con tinción para hematoxilina-eosina (HE) en los tiempos de estudio previamente señalados. Así, se observa en muestras histológicas obtenidas a 24 hrs en el grupo *sham*, una conservación de la estructura morfológica de los sinusoides hepáticos, así como de los sistemas portas con sus respectivas zonas morfofuncionales entre la triada portal y las venas centrales, situación que no varía respecto al grupo sometido a transección, en el que no se advierten cambios cualitativos significativos (Figura 10). A su vez, el grupo de ligadura portal no presenta variaciones morfológicas respecto a las características antes señaladas, preservándose la estructura sinusoidal y la arquitectura tisular. No obstante, los hepatocitos contienen numerosas vesículas citoplasmáticas de aspecto lipídico, compatible con esteatosis hepatocelular microvesicular, al que se agrega la aparición de figuras mitóticas aisladas (Figura 10). En el grupo sometido a modelo de ALPPS, la arquitectura tisular y disposición de

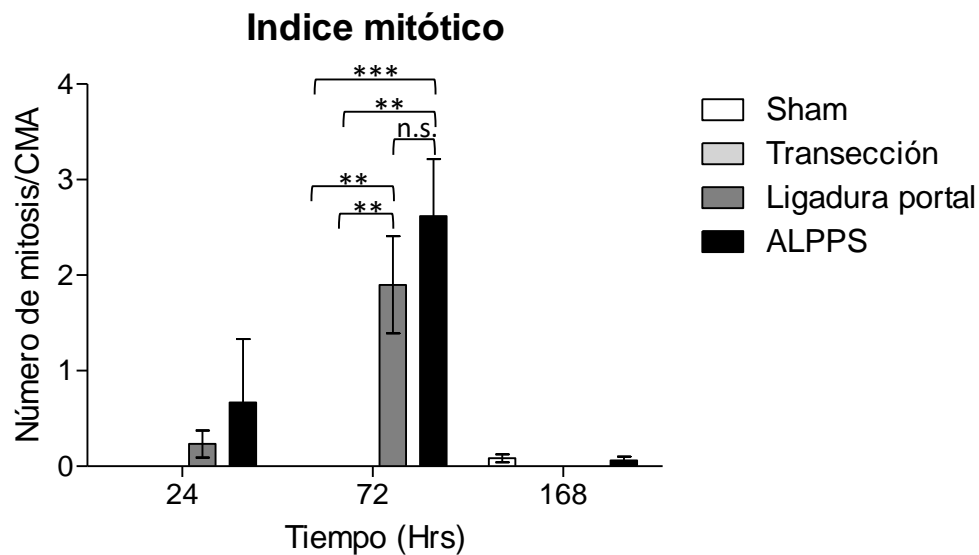
hepatocitos se encuentra conservada, aunque desde un punto de vista cualitativo, se observa una tendencia a leve dilatación de venas centrales y sinusoides hepáticos, cuyos hepatocitos muestran signos de esteatosis microvesicular más acentuada respecto a grupo de ligadura portal, con presencia de figuras mitóticas más frecuentes en distintas fases (Figura 10), si bien, no existen diferencias significativas en su recuento –índice mitótico- en este tiempo post operatorio entre ambos grupos (Figura 11).



**Figura 10.** Estructura tisular de muestras histológicas de tejido hepático remanente de ratas. Fotografías de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina en campos de mayor aumento (400X). Los círculos rojos indican figuras mitóticas en muestras de tejido hepático remanente.

A las 72 hrs de efectuados los distintos tratamientos quirúrgicos, en muestras histológicas con tinción HE, no existen grandes cambios en cuanto a las características morfológicas previamente descritas tanto en grupo *sham* como transección (Figura 10). No obstante, tanto en el grupo sometido a ligadura portal como a modelo de ALPPS, se observa

una significativa reducción del grado de esteatosis hepatocelular respecto al tiempo de estudio precedente, aunque persiste a la valoración histológica cualitativa, cierta tendencia a mayor persistencia de vacuolas citoplasmáticas en grupo ALPPS comparado a ligadura portal (Figura 10). Así también, en ambos grupos experimentales se advierte un significativo incremento en el recuento de figuras mitóticas por campo de mayor aumento (CMA) respecto a grupo control *sham* y a las ratas sometidas a transección, aunque no se logró establecer diferencias significativas en el índice mitótico cuantificado entre los grupos ALPPS y ligadura portal en este tiempo post operatorio (Figura 11). Finalmente, a los 7 días de realizados los procedimientos quirúrgicos, todos los hallazgos histológicos descritos tienden a la regresión, destacando una significativa reducción del índice mitótico tanto en grupo ligadura portal como ALPPS, existiendo en este último, una completa regresión de las vesículas citoplasmáticas previamente visualizadas (Figura 10).



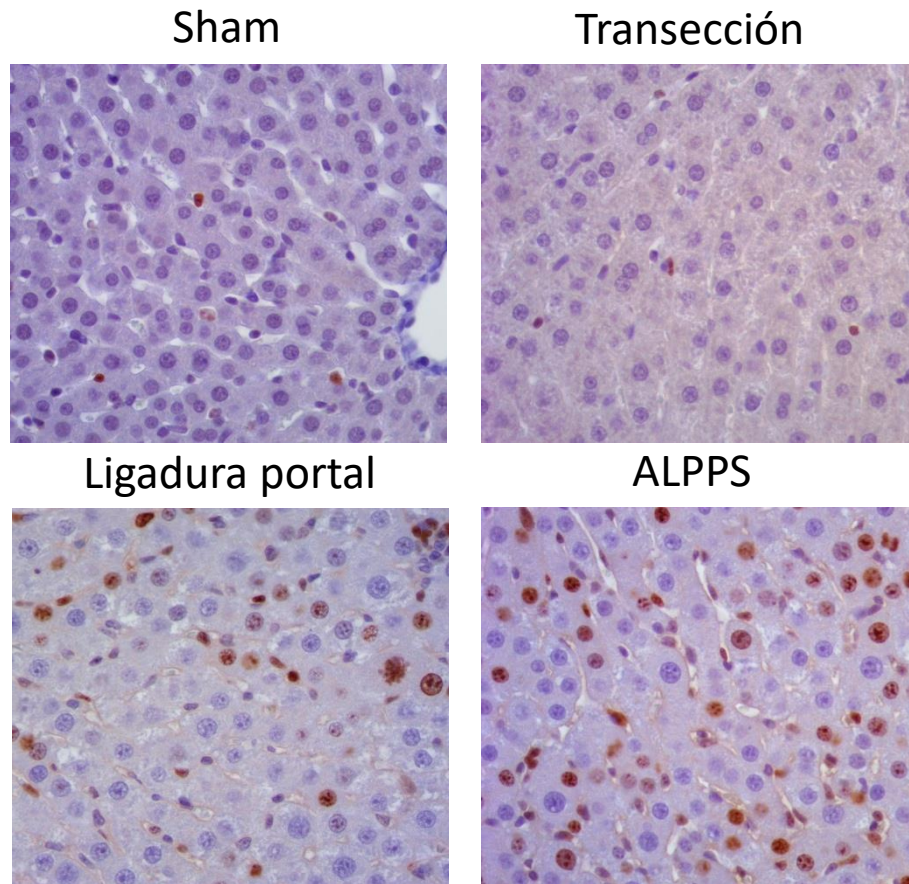
**Figura 11.** Índice mitótico en muestras histológicas de tejido hepático remanente de ratas. Cuantificación de figuras mitóticas en 10 campos de mayor aumento (CMA), (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). La ausencia de barra de significancia entre grupos o n.s. indica  $p > 0,05$ .



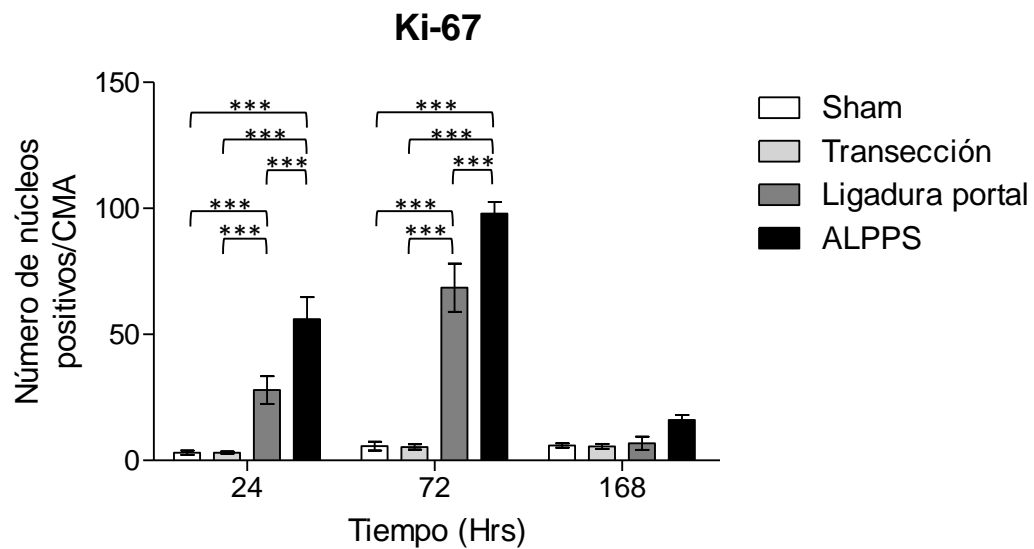
Para establecer una caracterización y cuantificación más detallada de la respuesta proliferativa celular en el tejido hepático remanente, se efectuó estudios inmunohistoquímicos para Ki-67, cuyo recuento de núcleos positivos en 20 CMA a las 24 y 72 hrs, muestra un significativo incremento tanto en grupos de ratas sometidas a ligadura portal como a modelo de ALPPS, comparado al observado en grupos controles *sham* y transección (Figura 12). Sin embargo, en ratas sometidas a ALPPS, en ambos tiempos de estudio, se establece un significativo mayor número de núcleos positivos para Ki-67 en relación a grupo ligadura portal; con  $p < 0,001$  a las 24 y 72 hrs, respectivamente (Figura 12). A su vez, desde el punto de vista cualitativo, en el grupo de ligadura portal las células que presentan núcleos positivos para Ki-67 se encuentran mayormente distribuidas en relación a la triada portal, es decir, corresponden en su mayoría a hepatocitos más cercanos al flujo de entrada arterio-portal (zona 1), a diferencia de lo observado en ratas sometidas a ALPPS, cuyas células Ki-67 positivas no muestran un patrón de distribución claramente definido, encontrándose ampliamente distribuidas tanto a nivel periportal como pericentral, en zonas 1, 2 y 3 (Figura 12). Es decir, en muestras de tejido hepático remanente de ratas sometidas a modelo de ALPPS a las 24 y 72 hrs, existe un reclutamiento más amplio de células para entrar activamente al ciclo celular.

De esta manera, mientras que en grupos *sham* y transección no existen variaciones significativas en los estudios inmunohistoquímicos para Ki-67 durante todo este proceso, todos los cambios descritos para los grupos de ligadura portal y ALPPS tienden a la regresión hacia los 7 días, alcanzando una situación de equilibrio sin diferencias significativas con respecto a los grupos controles *sham* y transección, hacia el fin de este proceso (Figura 12).

A.



B.



**Figura 12.** Hepatocitos Ki-67 positivos en muestras de tejido hepático remanente de ratas.

A. Fotografías de cortes histológicos en campos de mayor aumento (400X) B. Cuantificación de núcleos de hepatocitos Ki-67 (+) en tejido hepático remanente de grupos experimentales, (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

#### 4. Evaluación de marcadores de inflamación y progresión en regeneración hepática

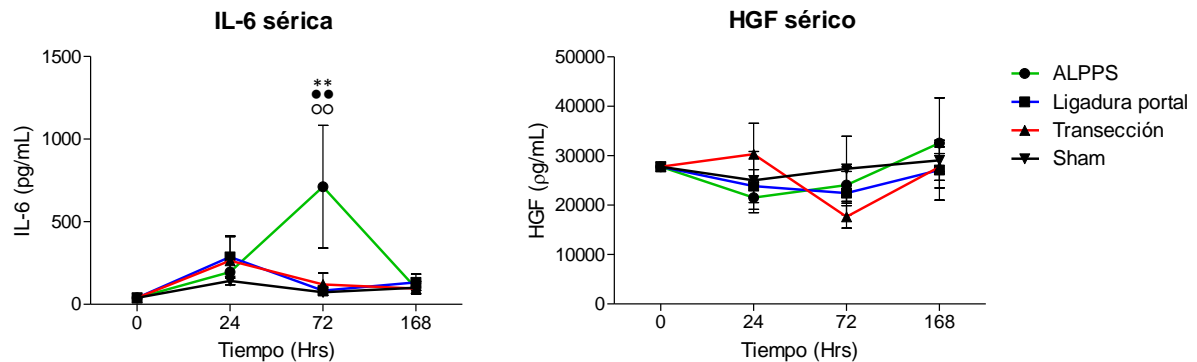
De acuerdo con el diseño experimental, se midió aleatoriamente en ratas seleccionadas en los distintos grupos quirúrgicos los marcadores serológicos de inflamación y progresión en regeneración hepática TNF- $\alpha$  e IL-6 en muestras de suero. Así, mientras no se encontró diferencias significativas en niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  entre los grupos experimentales en los distintos tiempos de estudio; se observa en los grupos de ligadura portal y transección un incremento transitorio a las 24 hrs de IL-6 sérica, sin establecerse diferencias significativas respecto al grupo control *sham*, persistiendo tanto en las 72 como 168 hrs en niveles basales (Figura 13). Sin embargo, en el grupo quirúrgico de animales sometidos a ALPPS, se objetiva un incremento progresivo de niveles de IL-6 plasmática alcanzando un nivel máximo a las 72 hrs ( $712,3 \pm 642,8$  pg/mL) con diferencias estadísticamente significativas respecto a todos los otros grupos experimentales ( $p < 0,01$ ), regresando a niveles basales a los 7 días.

En forma complementaria se efectuó mediciones de mRNA del gen de IL-6 en muestras de tejido del remanente hepático, observándose a las 24 hrs una tendencia al incremento de sus niveles en ratas sometidas a transección, aunque sin diferencias significativas respecto al grupo control *sham*, mientras que a su vez, el grupo de ligadura portal en este mismo tiempo de estudio, presenta un significativo incremento de la expresión de IL-6 respecto al grupo *sham* (Figura 13). Sin embargo, tanto a las 72 como 168 hrs post operatorias, en los grupos de transección y ligadura portal, se observa una significativa reducción de los niveles de expresión de IL-6 respecto al grupo control *sham* (Figura 13).

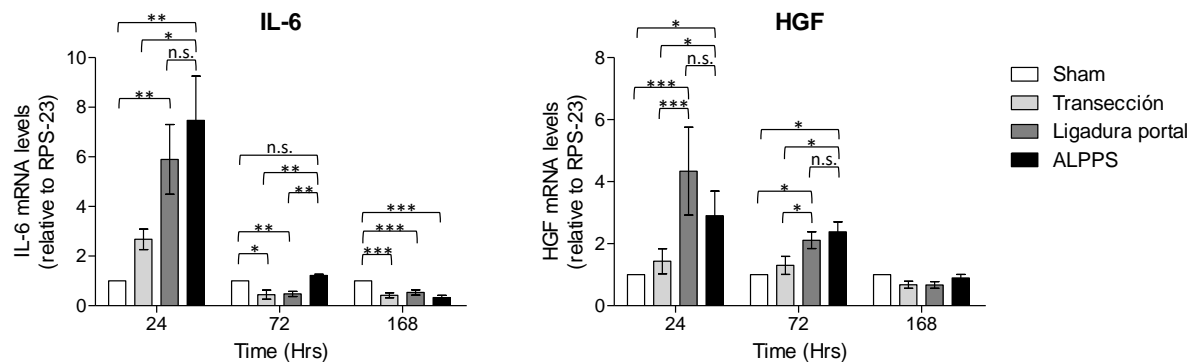
Por otro lado, las ratas sometidas a modelo de ALPPS, presentan un significativo incremento en los niveles de mRNA de IL-6 a las 24 hrs, equivalente a  $7,4 \pm 3,5$  veces el nivel de expresión observado en el grupo control *sham* ( $p < 0,01$ ), aunque sin diferencias

significativas respecto al grupo sometido a ligadura portal, seguido de una reducción en los niveles de expresión de IL-6 a las 72 hrs, que permanece en niveles similares al observado en grupo *sham*, si bien, es significativamente mayor comparado a los grupos sometidos a transección y ligadura portal ( $p < 0,01$ ; comparado a ambos casos) (Figura 13). Finalmente, en ratas ALPPS a los 7 días se objetiva una completa supresión de la expresión del gen IL-6, de forma similar al observado en grupo transección y ligadura portal (Figura 13). De esta manera, en conjunto estos resultados sugieren la presencia, en ratas sometidas a ALPPS, de una respuesta inflamatoria precoz y más persistente, respecto al resto de los grupos experimentales.

A.



B.



**Figura 13.** Marcadores de inflamación y progresión en regeneración hepática en ratas.

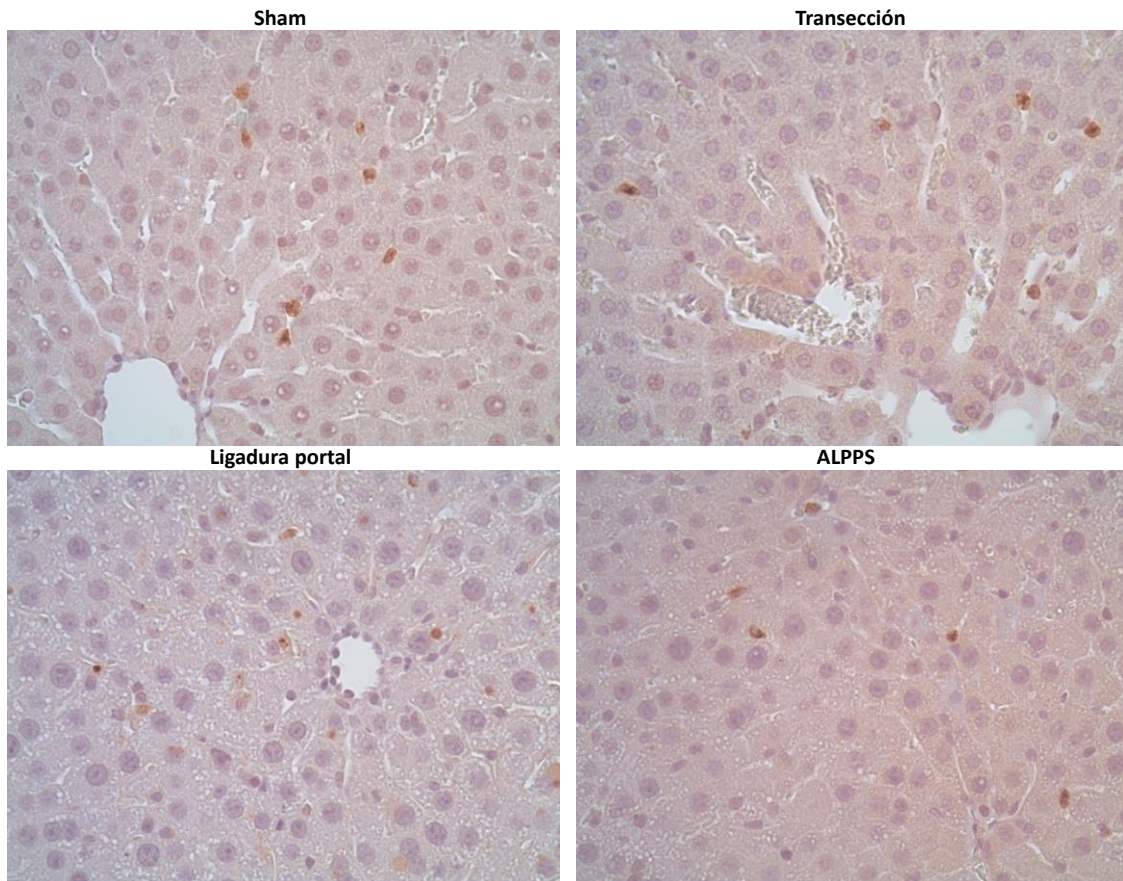
A. Cuantificación de niveles serológicos de IL-6 y HGF. Se muestra comparaciones estadísticas entre grupo ALPPS vs controles (\* ALPPS vs Ligadura portal; ● ALPPS vs transección; ○ ALPPS vs Sham). B. Expresión de IL-6 y HGF en muestras de tejido hepático remanente de grupos experimentales. Un símbolo indica  $p < 0,05$ ; dos símbolos  $p < 0,01$ ; tres símbolos  $p < 0,001$ . La ausencia de barra de significancia entre grupos o n.s. indica  $p > 0,05$ .

Con el objetivo de evaluar la naturaleza de la respuesta inflamatoria señalada, en muestras de tejido hepático remanente se realizaron estudios histológicos con tinción inmunohistoquímica específica para mieloperoxidasa. La valoración cualitativa de los distintos grupos experimentales no muestra diferencias importantes respecto al grado de infiltrado de polimorfonucleares existente en el espesor del parénquima, en los distintos tiempos post operatorios. Mientras que en los grupos de ratas sometidas sólo a transección o a modelo de ALPPS, se observó precozmente a las 24 hrs un significativo infiltrado de leucocitos adyacente a la zona del tejido hepático en el que se efectuó la transección, asociado a un importante depósito de fibras de colágeno (Figura 14).

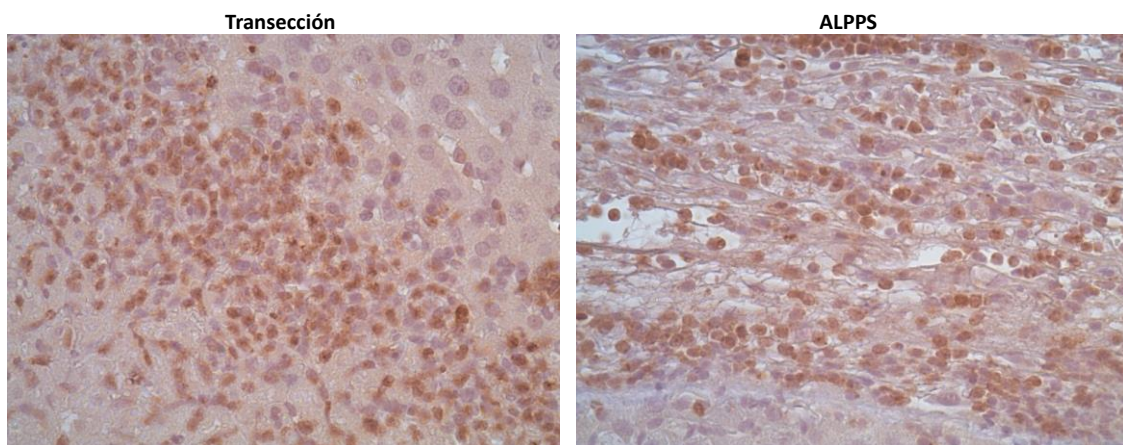
Estudios adicionales a nivel serológico fueron efectuados con el fin de evaluar marcadores específicos de progresión del fenómeno regenerativo hepático. Así, aun cuando no se objetivaron cambios significativos en los niveles séricos de HGF entre los distintos grupos experimentales (Figura 13), la cuantificación de mRNA de este gen mediante qRT-PCR en tejido hepático remanente, muestra un significativo aumento en la expresión de HGF en los grupos de ligadura portal y ALPPS tanto a las 24 como 72 hrs, comparado a ratas sometidas a cirugía *sham* y transección en tales tiempos de estudio (Figura 13). Además, cabe destacar que en tiempos precoces (24 y 72 hrs) no existen cambios significativos de expresión del gen HGF en el grupo de ratas sometidas a transección hepática respecto al grupo control *sham*, mientras que a las 168 hrs todos los grupos experimentales presentan niveles de expresión del gen HGF basales, sin cambios respecto al grupo control de cirugía *sham* (Figura 13).

Finalmente, se cuantificaron niveles serológicos de TGF- $\beta$ 1, éste último, asociado al término del proceso regenerativo hepático, sin embargo, no se logró establecer a nivel plasmático cambios significativos entre los distintos grupos de estudio.

A.



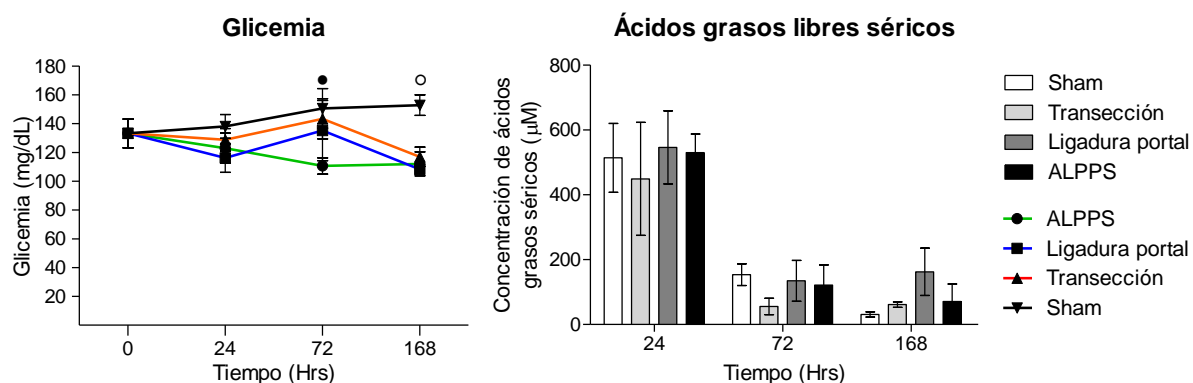
B.



**Figura 14.** Infiltrado inflamatorio por células mieloperoxidasa positivo en tejido hepático remanente de ratas. A. Fotografías de cortes histológicos en espesor de parénquima hepático a las 24 hrs post operatorio, en campos de mayor aumento (400X). Respuesta inflamatoria tisular no varía entre los grupos experimentales en el resto de los tiempos de estudio (no mostrado). B. Fotografía de cortes histológicos de zona de partición hepática en grupos experimentales ALPPS y transección a las 24 hrs.

## 5. Evaluación del estado metabólico sistémico y hepatocelular

Con el fin de estudiar el comportamiento del estado metabólico sistémico inducido por los diferentes tratamientos quirúrgicos, se midieron niveles de glucosa plasmática donde no se evidencian cambios importantes en el grupo control *sham* en los distintos tiempos analizados, mientras que en el resto de los grupos quirúrgicos –ALPPS, ligadura portal y transección– existe a los 7 días una reducción significativa en los niveles de glicemia respecto a éste (Figura 15). Así, las ratas sometidas a ALPPS presentan una tendencia a la disminución de la glicemia en las 72 hrs, con diferencias significativas respecto al grupo transección ( $110,5 \pm 12,5$  mg/dL vs  $155,1 \pm 37,1$  mg/dL;  $p < 0,05$ ), persistiendo estos niveles a los 7 días, donde se establecen diferencias con respecto a las ratas *sham* ( $112 \pm 20,3$  mg/dL vs  $152,8 \pm 17,3$  mg/dL;  $p < 0,05$ ) (Figura 15). Adicionalmente, se efectuaron análisis de los niveles de ácidos grasos libres séricos sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales en todos los tiempos estudiados (Figura 15).



**Figura 15.** Estado metabólico sistémico en ratas.

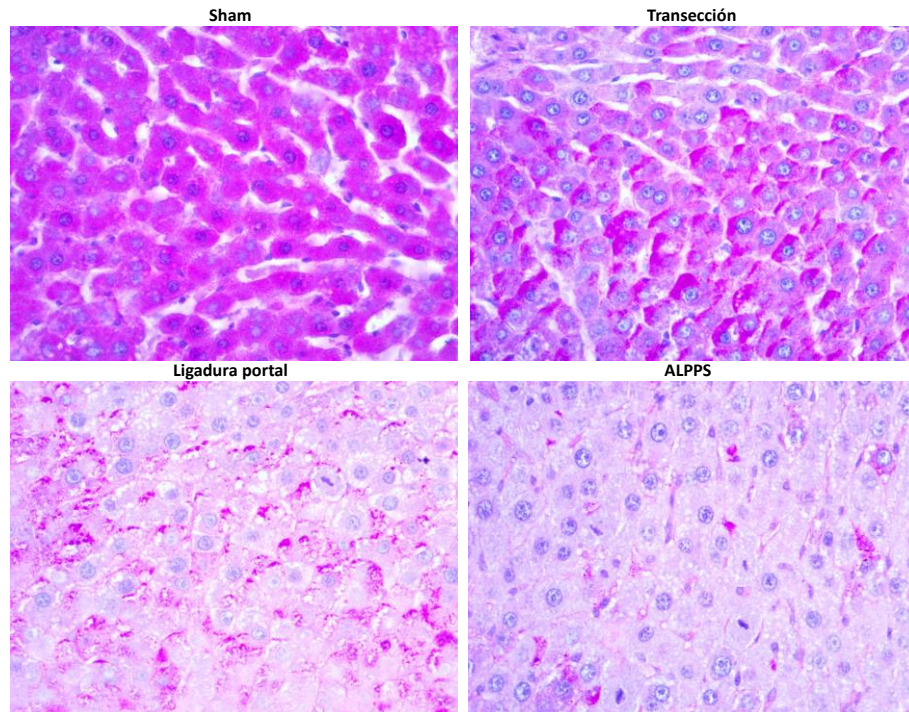
A la izquierda, niveles de glucosa plasmática en ratas sometidas a las intervenciones quirúrgicas en el tiempo. Se muestra comparaciones estadísticas entre grupo ALPPS vs controles (\* ALPPS vs Ligadura portal; ● ALPPS vs transección; ○ ALPPS vs Sham). Un símbolo indica  $p < 0,05$ ; dos símbolos  $p < 0,01$ ; tres símbolos  $p < 0,001$ . A la derecha, cuantificación de los ácidos grasos libres séricos, no hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos de estudio.

En orden a analizar cambios metabólicos a nivel hepatocelular secundarios a los tratamientos quirúrgicos efectuados en cada grupo experimental, se estudió en muestras histológicas de tejido hepático remanente el contenido de glucógeno hepático mediante la tinción de ácido peryódico Schiff (Figura 16). Así, se cuantificó en ratas controles *sham* un mayor depósito de glucógeno hepatocelular comparado al resto de los grupos quirúrgicos en cada uno de los tiempos de estudio post operatorios, aunque sin diferencias significativas con respecto al grupo transección a las 72 hrs, existiendo en éste último grupo de ratas una moderada –aunque estadísticamente significativa- disminución del contenido de glucógeno hepatocelular en el resto de los tiempos analizados. A su vez, se evidenció una significativa reducción del contenido de glucógeno hepático en los grupos ligadura portal y ALPPS comparado con el grupo *sham*, existiendo una manifiesta tendencia a mayor reducción del contenido de glucógeno hepatocelular en ALPPS tanto a las 24 hrs como a los 7 días, aunque sin establecerse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Figura 17).

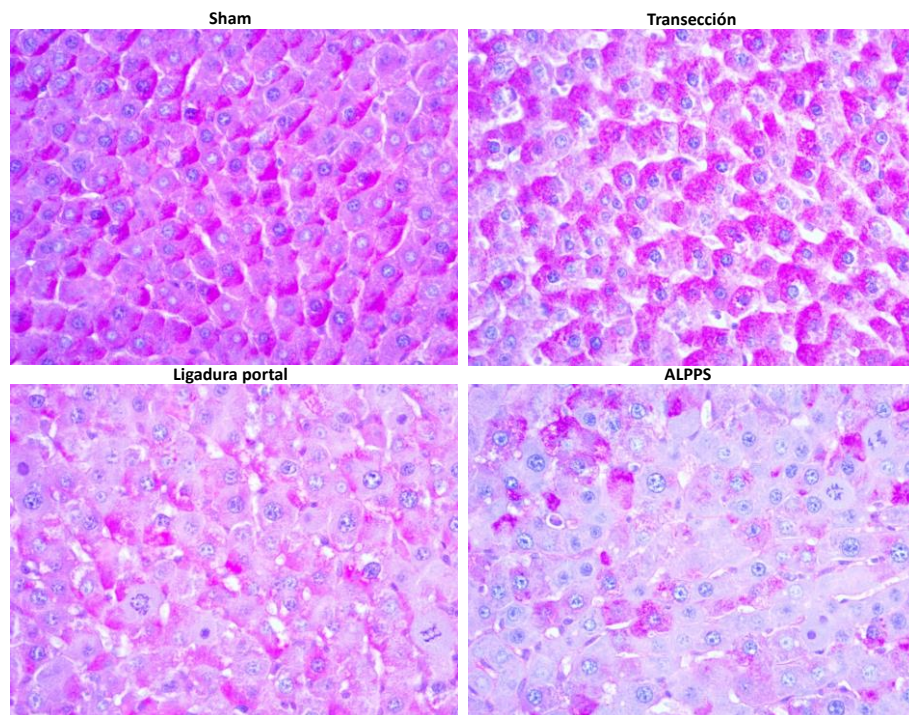
Desde un punto de vista cualitativo, las ratas *sham* y aquellas sometidas únicamente a transección, presentan mayor cantidad de glucógeno en hepatocitos periportales que pericentrales en los distintos tiempos post quirúrgicos. Sin embargo, tal patrón de distribución cambia en el grupo ligadura portal donde se observa una menor cantidad de glucógeno hepatocelular en la zona 1 que en los hepatocitos centrolobulillares, siendo más acentuada tales diferencias a los 7 días. Por otro lado, si bien la distribución de la tinción en el grupo ALPPS es similar a la descrita en ligadura portal, el contenido global de glucógeno hepatocelular tiende a ser de menor magnitud, siendo las diferencias de tinción más tenue entre las distintas zonas (Figura 16).



A.



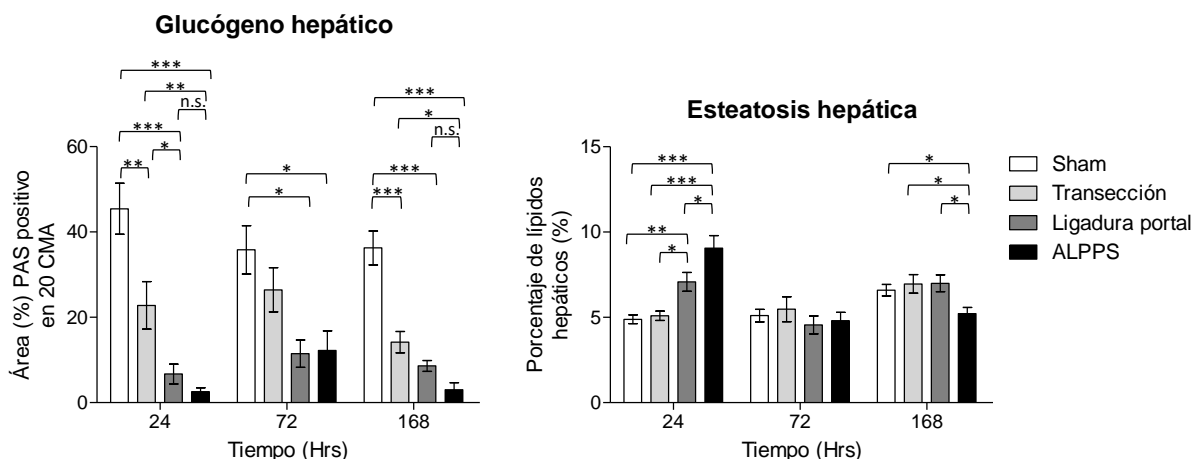
B.



**Figura 16.** Evaluación de contenido de glucógeno tisular en tejido hepático remanente de ratas.

A. Fotografías de cortes histológicos teñidos con ácido peryódico Schiff (PAS) a las 24 hrs post operatorio, en campos de mayor aumento (400X). B. Fotografías de cortes histológicos teñidos con PAS a las 72 hrs en CMA (400X).

Adicionalmente, se cuantificó el contenido de ácidos grasos en extractos de tejido hepático remanente, cuyos resultados fueron expresados en términos de fracción (%) de tejido analizado. De esta manera, se ha podido establecer a las 24 hrs, un significativo aumento del grado de esteatosis hepática en el grupo sometido a ligadura portal comparado a grupo control *sham* ( $7,079 \pm 1,355$  % vs  $4,886 \pm 0,629$  %;  $p < 0,01$ ), así como respecto al grupo transección, cuyo porcentaje de lípidos hepáticos alcanza  $5,091 \pm 0,675$  % ( $p < 0,05$ ) (Figura 17). A su vez, el grupo sometido a ligadura portal presenta una significativa reducción del grado de esteatosis hepática a las 72 hrs, alcanzando niveles similares a los observados en los grupos control *sham* y transección, situación que se reproduce en las mediciones efectuadas a los 7 días, donde tampoco se establecieron diferencias estadísticas entre los grupos de estudios señalados. A su vez, las ratas sometidas a transección, no presentan variaciones significativas en todos los tiempos analizados comparados a las mediciones efectuadas en el grupo *sham* (Figura 17).



**Figura 17.** Estado metabólico hepatocelular en ratas.

A la izquierda, cuantificación de glucógeno hepático expresado en área con tinción de PAS (+) en cortes histológicos de tejido hepático remanente de ratas. A la derecha, cuantificación de lípidos en tejido hepático remanente expresado en porcentaje respecto a la masa hepatocelular total, (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Las ratas sometidas a modelo de ALPPS, presentan un significativo incremento del contenido de lípidos en el tejido hepático remanente a las 24 hrs equivalente a  $9,055 \pm 1,811$

%, lo que supera ampliamente los niveles observados en los otros grupos experimentales (Figura 17). Así, mientras se objetivó una significativa reducción del grado de esteatosis hepatocelular a las 72 hrs, sin cambios respecto a los grupos controles –*sham*, transección y ligadura portal-, a los 7 días se manifiesta un menor contenido de lípidos hepatocelulares en ratas ALPPS, que en términos estadísticos representan una cantidad significativamente menor a las obtenidas en los grupos experimentales *sham*, transección y ligadura portal (Figura 17).

#### 6. Activación de la vía de señalización mTOR

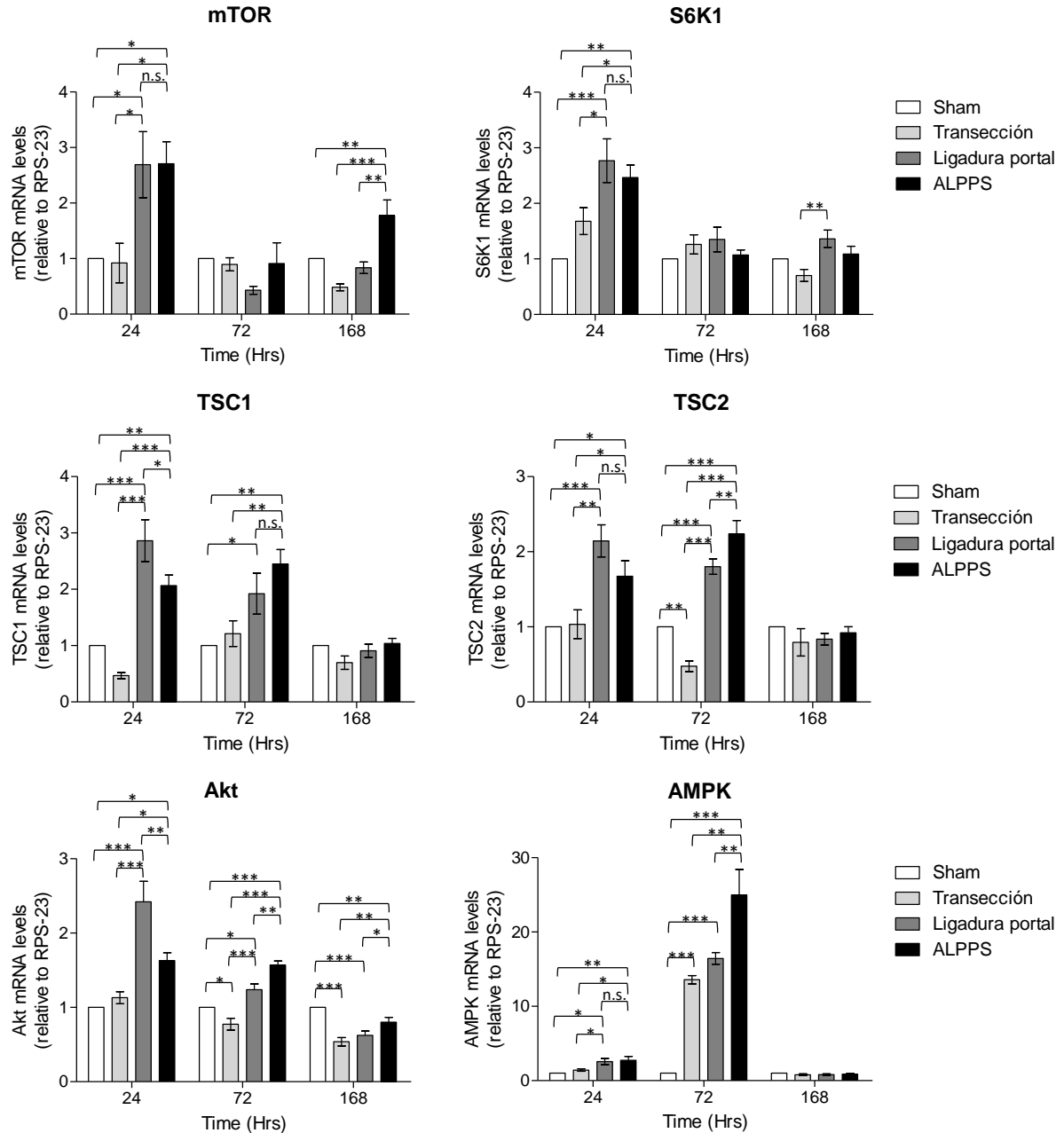
Con el propósito de abordar desde una perspectiva molecular los eventos que pudiesen explicar el aumento de masa del tejido hepático remanente, que en base a los hallazgos presentados ponen en evidencia una repuesta prorregenerativa del tejido hepatocelular tanto en ratas sometidas a ligadura portal, y en mayor magnitud, a modelo de ALPPS; mediante estudios de qRT-PCR se determinó el nivel de expresión de diversos genes que conforman la vía de señalización de mTOR, debido a su conocida implicancia en la regulación de procesos de naturaleza anabólica a nivel intracelular [110, 112].

En este sentido, se determinó a las 24 hrs un significativo incremento en los niveles de mRNA, y por lo tanto, en la expresión del gen mTOR, en ratas sometidas a ligadura portal y a ALPPS, respecto al control *sham* y al grupo transección, aunque sin diferencias significativas entre ambos (Figura 18). A su vez, a las 72 hrs, tanto en el grupo ligadura portal como ALPPS, existe una reducción del contenido de mRNA de mTOR respecto al tiempo de estudio previo, sin establecerse diferencias significativas en relación a los otros grupos controles –*sham* y transección-, objetivándose hacia el séptimo día post operatorio un incremento significativo en los niveles de mRNA de mTOR en grupo sometido a modelo de ALPPS, comparado a todos los grupos experimentales –*sham*, transección y ligadura portal- (Figura 18).

Así, los hallazgos obtenidos en los niveles de expresión del gen mTOR, se corresponden con las cuantificaciones de mRNA efectuadas para genes localizados río abajo de esta vía de señalización, observándose un significativo incremento en la expresión del gen S6K1 en los grupos ligadura portal y ALPPS a las 24 hrs, comparado a ratas *sham* y transección; aunque sin establecerse diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales, en los siguientes tiempos de estudio (Figura 18).

De esta manera, se advierte en el grupo sometido a ALPPS, un precoz incremento en la expresión del gen mTOR –y de su efector río abajo S6K1-, que tras un periodo transitorio de disminución de su expresión –*downregulation*-, se vuelve a recuperar hacia el séptimo día. Así, con el fin de determinar el grado de activación a nivel proteico mediante la cuantificación con técnica de western blot de la proteína mTOR en su estado nativo y fosforilado, en el grupo de ratas sometido a ALPPS se encontró un significativo incremento en la cantidad de proteína mTOR en su estado fosforilado –es decir, de su forma activada-, así como de la relación mTOR fosforilado/no fosforilado a las 24 hrs comparado a la situación basal representada por el grupo control *sham* ( $p < 0,05$ ) (Figura 19), lo que sugiere que en ratas ALPPS la vía de señalización dependiente de mTOR, no sólo se encuentra amplificada a nivel de expresión génica, sino que además está significativamente activada a nivel proteico.

En un intento por explorar los fenómenos involucrados río arriba de mTOR, se analizó el nivel de expresión de genes que controlan la activación de esta vía de señalización, determinándose un significativo aumento en los niveles de mRNA de los genes que conforman el heterodímero TSC1/TSC2 a las 24 y 72 hrs, tanto en ratas sometidas a ligadura portal como en aquellas sometidas a modelo de ALPPS, comparado a los grupos control *sham* y transección (Figura 18).



**Figura 18.** Expresión de genes relacionados a la vía de señalización de mTOR en muestras de tejido hepático remanente de ratas.

Se muestra comparaciones estadísticas entre grupos (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). La ausencia de barra de significancia entre grupos o n.s. indica p>0,05.

Así, mientras el nivel de amplificación de TSC1 y TSC2 es comparable en los grupos ligadura portal y ALPPS en los tiempos señalados, algunas diferencias con significancia estadística se observan en TSC1 a las 24 hrs y en TSC2 a las 72 hrs, a favor del grupo ligadura

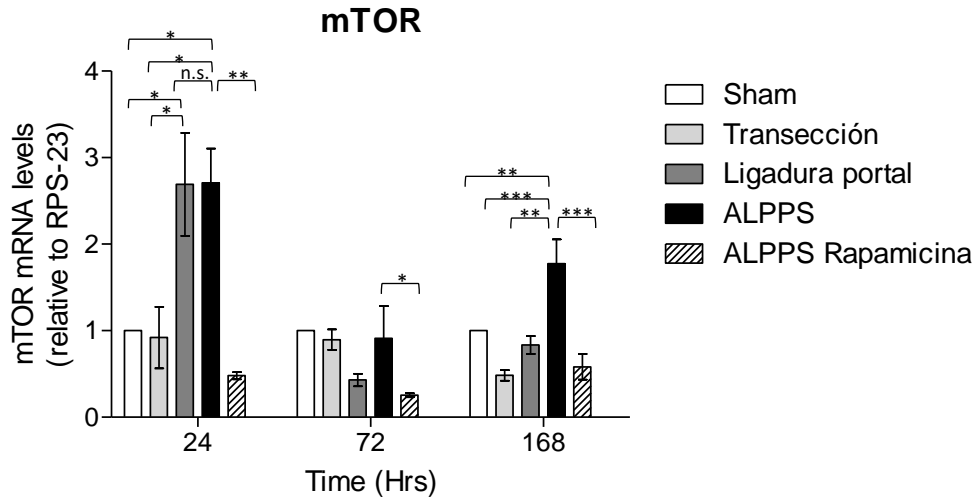
portal y modelo de ALPPS, respectivamente (Figura 18). A su vez, se observa que el grupo ALPPS presenta una tendencia al aumento en los niveles de expresión de ambos genes durante las primeras 72 hrs, luego del cual, a los 7 días se establece una condición de equilibrio entre todos los grupos de estudio (Figura 18).

Debido a que la acción biológica del heterodímero TSC1/TSC2 es dependiente de la acción de los mediadores río arriba Akt y AMPK, cuya activación conduce a respuestas antagónicas sobre mTOR, se cuantificó mediante qRT-PCR el grado de expresión de los genes que codifican para Akt y la subunidad  $\alpha$  de AMPK. Así, si bien a las 24 hrs no se evidencia cambios significativos en la cantidad de mRNA de Akt en ratas sometidas a transección versus el control *sham* ( $p>0,05$ ), sí se observó una significativa reducción en la expresión de este gen a las 72 hrs y 7 días ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ ; respectivamente) (Figura 18). Por otro lado, el grupo de ligadura portal presenta un significativo incremento en los niveles de mRNA a las 24 hrs vs *sham*, transección y ALPPS ( $p<0,001$ ,  $p<0,001$  y  $p<0,01$ ; respectivamente), el cual disminuye marcadamente a las 72 hrs, cuya expresión persiste elevada vs *sham* ( $p<0,05$ ) y transección ( $p<0,001$ ), hasta el bloqueo de su expresión a los 7 días ( $p<0,001$  vs *sham*) (Figura 18).

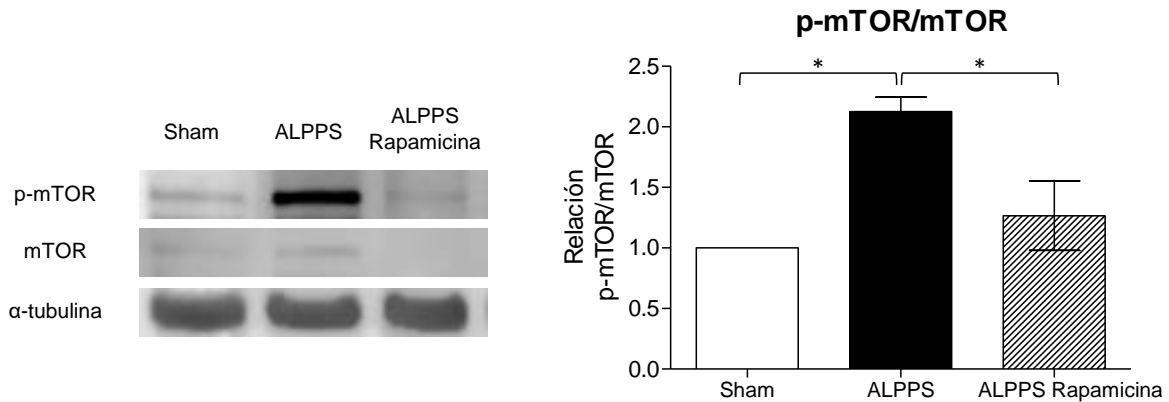
A diferencia de los grupos experimentales previos, las ratas sometidas a modelo quirúrgico de ALPPS presentan un significativo aumento en la expresión del gen Akt a las 24 hrs versus el control *sham* ( $p<0,05$ ) y transección ( $p<0,05$ ), aunque en una magnitud moderada respecto al grupo ligadura portal, donde se establece diferencia estadística entre ambos ( $p<0,01$ ) (Figura 18). Sin embargo, en las ratas ALPPS los niveles de mRNA de Akt persisten elevados en forma sostenida a las 72 hrs, y en una magnitud significativamente mayor a todos los grupos experimentales, incluyendo al grupo ligadura portal ( $p<0,01$ ), luego del cual se

estabiliza y disminuyen al séptimo día respecto al control *sham*, aunque se mantiene en niveles mayores en relación a los grupos transección y ligadura portal (Figura 18).

A.



B.



**Figura 19.** Efectos de rapamicina en la expresión génica y activación proteica de mTOR en tejido hepático remanente de ratas.

A. Niveles de expresión génica de mTOR en muestras de tejido hepático remanente en distintos grupos experimentales, y bajo los efectos de rapamicina en grupo ALPPS. B. A la izquierda fotografía de membrana de western blot de proteínas mTOR fosforilada, nativa y control de carga con  $\alpha$ -tubulina. Foto es representativa de estudio realizado en grupos Sham, ALPPS y ALPPS bajo efectos de rapamicina (n=1) a las 24 hrs. A la derecha, cuantificación de la relación p-mTOR/mTOR en muestras de tejido hepático remanente en ratas Sham, ALPPS y ALPPS bajo los efectos de rapamicina a las 24 hrs. Se expresa resultado normalizado a grupo control Sham, (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). La ausencia de barra de significancia entre grupos o n.s. indica  $p > 0,05$ .

Finalmente, se midió la expresión del gen que codifica a la subunidad  $\alpha$  catalítica de AMPK, advirtiéndose, tal como lo obtenido en los resultados de los genes precedentes, la ausencia de cambios significativos en el contenido de mRNA de AMPK en ratas sometidas a

transección versus el control *sham* ( $p>0,05$ ) a las 24 hrs (Figura 18). A su vez, en este mismo tiempo de estudio, tanto en el grupo sometido a ligadura portal como a modelo de ALPPS, se encuentra un significativo incremento de la expresión génica de AMPK comparado a ratas *sham* y grupo transección, aunque sin diferencias entre ambos (Figura 18).

A las 72 hrs, a diferencia de lo observado en los estudios de los genes de la vía de señalización previamente analizados, existe un incremento de la expresión de AMPK en los grupos transección, ligadura portal y ALPPS comparado al control *sham*, ( $p<0,001$ ,  $p<0,001$  y  $p<0,001$ , respectivamente), destacando el significativo aumento de los niveles de mRNA del gen AMPK en el grupo sometido al modelo ALPPS, el que supera ampliamente el obtenido en los grupos ligadura portal ( $p<0,01$ ) y transección ( $p<0,01$ ), cuyo nivel de expresión entre estos dos últimos resulta comparable ( $p>0,05$ ) (Figura 18). Por último, todos los cambios previamente descritos en relación a este gen se normalizan y alcanzan la situación de equilibrio a las 168 hrs (Figura 18).

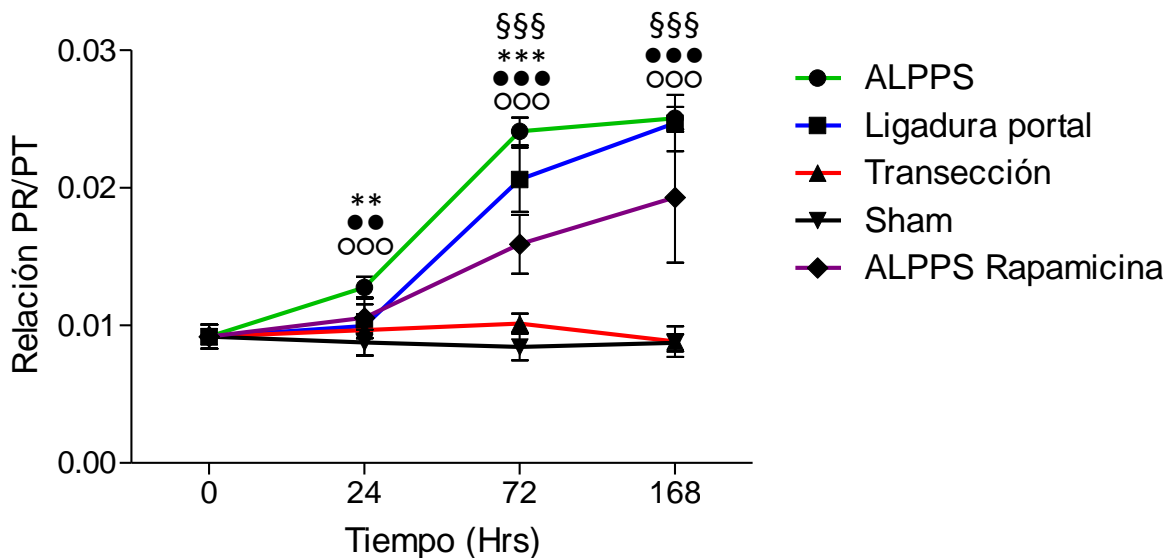
#### 7. Efectos de la rapamicina sobre la vía de señalización de mTOR y ganancia de masa hepática

En conjunto todos los resultados previamente señalados ponen en evidencia una respuesta prorregenerativa del tejido hepatocelular remanente en ratas sometidas a modelo de ALPPS, que a su vez, se asociaría a la inducción y activación de la vía de señalización de mTOR. Así, con el objetivo de determinar el rol e impacto de la activación de esta vía molecular en el proceso de regeneración hepática observado, un grupo de ratas ( $n=18$ ) fue sometido a este procedimiento quirúrgico bajo los efectos del fármaco rapamicina, compuesto con conocido mecanismo de acción inhibitoria sobre mTOR [110, 112].



De esta manera, las ratas sometidas a ALPPS bajo los efectos de rapamicina, presentan a las 24, 72 y 168 hrs un bloqueo de la expresión del gen que codifica mTOR (Figura 19), que a su vez, se corresponde con una significativa disminución en la relación de proteína mTOR fosforilada/no fosforilada a las 24 hrs (Figura 19), es decir, rapamicina no sólo inhibe la expresión del gen de mTOR, sino que además, reduce significativamente la cantidad de proteína en su forma activa –proteína fosforilada- en el tiempo en el que mayormente ésta se encuentra inducida tras la realización de ALPPS (Figura 19).

Finalmente, junto a los efectos de rapamicina sobre la vía de señalización de mTOR, tanto a nivel de expresión génica, así como de activación proteica; se observa una significativa reducción en la ganancia de masa de tejido hepático remanente en ratas sometidas a modelo de ALPPS bajo los efectos de este fármaco a las 72 y 168 hrs comparado a grupo ALPPS sin rapamicina ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ ; respectivamente), así como respecto a grupo ligadura portal en los mismos tiempos de estudio ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ ; respectivamente) (Figura 20).



**Figura 20.** Efectos de rapamicina en incremento de masa hepática post ALPPS en ratas. Se muestra comparaciones estadísticas entre grupo ALPPS vs controles (\* ALPPS vs Ligadura portal; ● ALPPS vs transección; ○ ALPPS vs Sham; § ALPPS vs ALPPS rapamicina). Un símbolo indica  $p < 0,05$ ; dos símbolos  $p < 0,01$ ; tres símbolos  $p < 0,001$ . PR/PT, es la relación entre peso del remanente hepático y el peso corporal total.

## 6.2 Estudios en pacientes sometidos a ALPPS

### 1. Caracterización clínica de pacientes sometidos a ALPPS

Se reclutó en forma prospectiva un grupo de pacientes (n=11), quienes se sometieron a resección de lesiones neoplásicas hepáticas mediante técnica de ALPPS, durante el periodo comprendido entre 2013-2015 en el Servicio de Cirugía del Hospital del Salvador. La media de edad fue  $58,8 \pm 8$  años (rango 41 a 70 años), siendo las metástasis hepáticas de origen colorrectal el principal motivo de la intervención (Tabla 2).

Variable	Pacientes (n=11)
Edad (años), media (DE)	58,8 ( $\pm 8,042$ )
Sexo masculino/femenino, número (%)	6/5 (54,5%/45,5%)
Tipo de tumor	
Metástasis cáncer colorrectal, n (%)	9 (81,8)
Metástasis tumor neuroendocrino, n (%)	1 (9,1)
Hepatocarcinoma, n (%)	1 (9,1)
§ Índice de Charlson ajustado por edad, mediana (RIC)	8 (7-9)
<i>Performance status</i> , mediana (RIC)	0 (0-0)
Quimioterapia pre ALPPS, n (%)	10 (90,9%)
Tipo de quimioterapia, n (n° ciclos/paciente)	
XELOX	6 (ciclos 3, 3, 3, 6, 8 y 8 ciclos)
FOLFOX	1 (4 ciclos)
FOLFOXIRI	1 (6 ciclos)
FOLFIRI + Bevacizumab	1 (4 ciclos de FOLFIRI + 3 ciclos Bevacizumab)
XELODA	1 (3 ciclos)
90YDOTATOC/Lu177-DOTATATE	1 (4 dosis Lu177-DOTATATE)
Radioterapia pre ALPPS, n (%)	1 (9,1%)

XELOX: Oxaliplatino, Capecitabina; FOLFOX: Ácido folínico, 5-fluorouracilo, Oxaliplatino; FOLFOXIRI: Ácido folínico, 5-Fluorouracilo, Oxaliplatino, Irinotecán; FOLFIRI: 5-Fluorouracilo, Irinotecán, Leucovorina; XELODA: Capecitabina.  
§ Índice de Charlson es un método validado para cuantificación de comorbilidades.  
RIC: rango intercuartílico; DE: desviación estándar

**Tabla 2.** Características clínicas de pacientes sometidos a ALPPS.

Adicionalmente, se incluyeron en el estudio dos pacientes con lesiones no colorrectales, uno con metástasis hepáticas de tumor neuroendocrino pancreático cuyo

primario había sido resecado mediante pancreatocromía distal y esplenectomía el año 2003, manteniéndose controlado con quimioterapia hasta que presentó recidiva tumoral hepática; mientras que el segundo caso correspondió a un paciente con hepatocarcinoma en hígado basalmente sano –sin daño hepático crónico-.

Todos los pacientes previamente a la intervención tenían un *performance status* óptimo, sin comorbilidades mayores que contraindicaran la cirugía (Tabla 2). El 90,9% (n=10/11) de los pacientes recibió algún tipo de quimioterapia sistémica antes de la cirugía hepática, la mayoría con al menos 3 ciclos de quimioterapia convencional (rango 3 a 8 ciclos), y en algunos casos con tratamientos de segunda línea (Tabla 2), a excepción del paciente con hepatocarcinoma que fue directamente a ALPPS sin terapia sistémica de base.

Variable	Pacientes
Tipo de ALPPS, n (%)	
• Hepatectomía derecha extendida	11 (100%)
• <i>Clearence</i> lóbulo hepático izquierdo	3 (27,3%)
• Resección nódulo peritoneal	1 (9,1%)
Tiempo operatorio ALPPS I, media min (DE)	258 (±68)
Tiempo operatorio ALPPS II, media min (DE)	275 (±83)
Sangrado estimado ALPPS I	
• < 600 ml, n (%)	6 (54,5%)
• 600-1000 ml, n (%)	2 (18,2%)
• > 1000 ml, n (%)	3 (27,3%)
Sangrado estimado ALPPS II	
• < 600 ml, n (%)	2 (18,2%)
• 600-1000 ml, n (%)	2 (18,2%)
• > 1000 ml, n (%)	7 (63,6%)
Transfusión U GR intraoperatoria ALPPS I	
• Pacientes transfundidos, n (%)	3 (27,3%)
• U GR, mediana (RIC)	0 (0-2)
Transfusión U GR intraoperatoria ALPPS II	
• Pacientes transfundidos, n (%)	8 (72,7%)
• U GR, mediana (RIC)	3 (0-4)
Días entre ALPPS I – II, mediana (RIC)	14 (12-14)
Días entre ALPPS y TAC de control para volumetría, media (DE)	9,1 (±1,59)

U GR: unidades de glóbulos rojos; RIC: rango intercuartílico; DE: desviación estándar

**Tabla 3.** Características operatorias de pacientes sometidos a ALPPS.

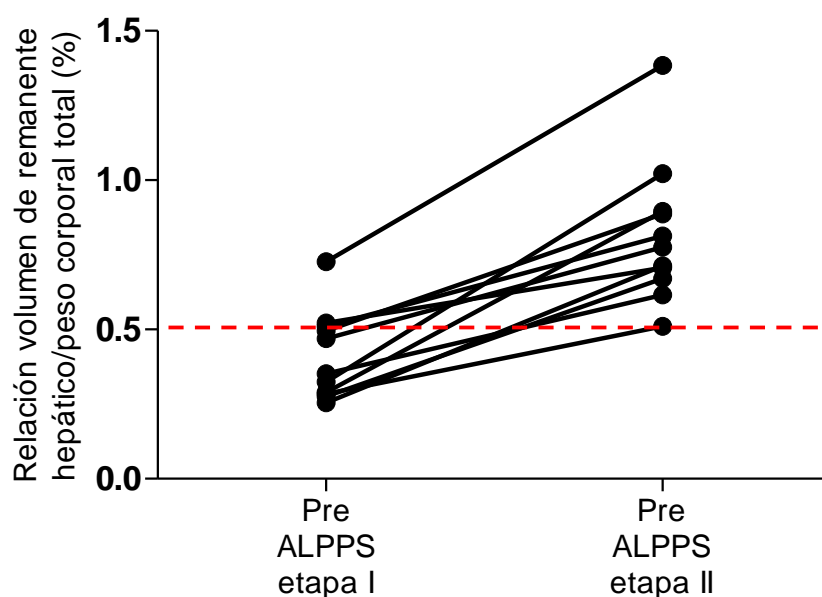
En todos los casos se efectuó la técnica de ALPPS como terapia puente para la realización de una hepatectomía derecha extendida, complementándose ya sea en el primer o segundo tiempo operatorio, resecciones y/o alcoholización de lesiones metastásicas en el remanente hepático (segmentos II-III) (Tabla 3). En esta serie de casos, todos los pacientes completaron el segundo tiempo quirúrgico resectivo (n=11/11, 100%), en una mediana de 14 días (RIC 12-14 días) mientras que la realización del control tomográfico para la estimación del aumento de volumen del remanente se efectuó en una media de  $9,1 \pm 1,59$  días de realizado el primer tiempo operatorio del ALPPS (Tabla 3).

## 2. Cambios biométricos del tejido hepático remanente

En cada caso se registró el peso, la talla y el índice de masa corporal, junto a las mediciones volumétricas del remanente hepático tanto previo como posterior al primer tiempo quirúrgico del ALPPS mediante el software OsiriX®. La media de volumen del remanente hepático futuro estimado pre ALPPS fue  $298,5 \pm 103,4$  mL, aumentando hasta  $588,7 \pm 141,1$  mL, lo que equivale a una ganancia absoluta de volumen de  $290,3 \pm 107,8$  mL entre la primera y segunda etapa quirúrgica del ALPPS (Figura 21).

Así, en este grupo de pacientes el volumen del remanente hepático se incrementó un  $111,6 \pm 63,47\%$  (rango 35 a 214%) en un tiempo de 9 días, alcanzando una cinética de ganancia volumétrica de  $34,43 \pm 17,27$  mL/día (Figura 21). Como índice de suficiencia volumétrica del remanente hepático se cuantificó la relación entre el remanente hepático futuro y la masa corporal total de cada paciente, objetivándose un aumento desde  $0,4 \pm 0,14\%$  a  $0,81 \pm 0,23\%$  tras la realización de ALPPS (Figura 21).

Variable	Media (DE)
Aumento de volumen absoluto, (ml)	290,3 (±107,8)
Aumento de volumen relativo, (%)	111,6 (±63,47)
Cinética de ganancia volumétrica, (ml/día)	34,43 (±17,27)
PR/PT Pre ALPPS 1° etapa, (%)	0,4 (±0,14%)
PR/PT Pre ALPPS 2° etapa, (%)	0,81 (±0,23%)

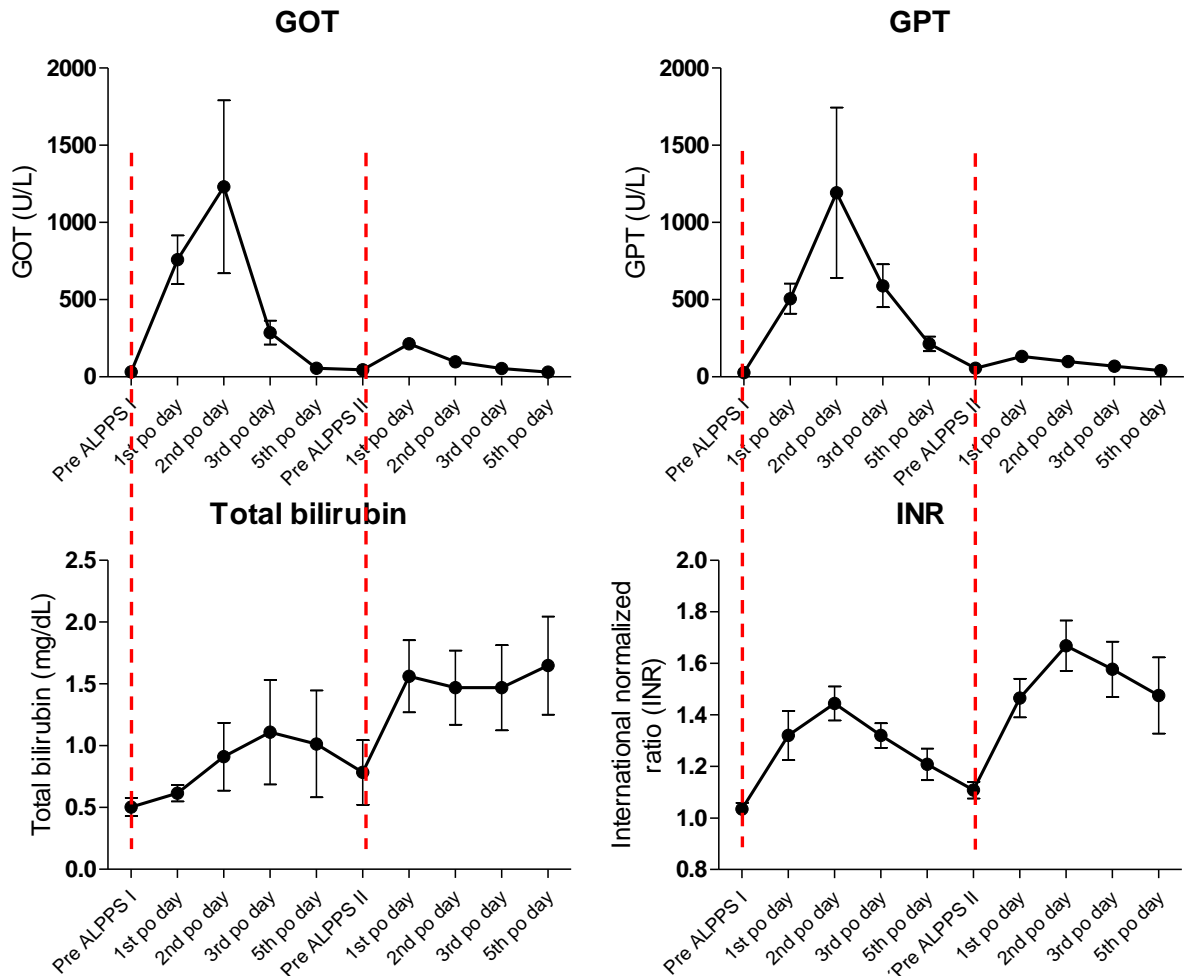


**Figura 21.** Cambios biométricos del tejido hepático remanente de pacientes sometidos a ALPPS. PR/PT corresponde a la relación entre el peso del remanente hepático estimado (g) y la masa corporal total (g), cuantificado en %. Debido a que la densidad del tejido hepático es cercana a 1, el volumen del remanente expresado en mL, es equivalente a su peso en g. Línea roja indica (PR/PT=0,5%) considerado límite de suficiencia hepática para la realización de una hepatectomía segura. Todos los pacientes sometidos a ALPPS, tras el periodo de ganancia volumétrica superan tal indicador. DE: desviación estándar.

### 3. Función hepática post operatoria e insuficiencia hepática post operatoria

Tras la realización del primer tiempo operatorio –que incluye la ligadura de la rama portal derecha y transección del parénquima- se observó un significativo incremento en los niveles séricos de las transaminasas GOT y GPT, alcanzando niveles máximos a las 48 hrs tras la cirugía ( $1230 \pm 1770$  U/L y  $1192 \pm 1746$  U/L respectivamente), luego del cual, se

normalizan y persisten en niveles bajos tras la realización del segundo tiempo quirúrgico resectivo (Figura 22). La bilirrubina sérica total en este grupo de pacientes presenta un leve incremento tras la primera etapa del ALPPS, seguido de un aumento adicional tras la hepatectomía en el segundo tiempo operatorio, alcanzando niveles máximos al 5° día post quirúrgico con una media de  $1,64 \pm 1,31$  mg/dL. A su vez, el INR medido en estos pacientes presenta dos alzas cuantificadas en el 2° día posterior a ambos tiempos quirúrgicos, siendo mayor tras la hepatectomía ( $1,66 \pm 0,3$ ) (Figura 22).



**Figura 22.** Pruebas de función y/o daño hepatocelular perioperatorios en pacientes sometidos a ALPPS. Líneas segmentadas rojas indican tiempos quirúrgicos de primer y segundo tiempo operatorio.

Ninguno de los pacientes incluidos en este estudio cumplió con los criterios bioquímicos establecidos para insuficiencia hepática post operatoria evaluados al 5° día post hepatectomía –“Criterios 50-50”- [27], esto es bilirrubina sérica total  $>3$  mg/dL e INR  $>1,7$ ; sin embargo, un paciente presentó elevación progresiva de bilirrubina total y de INR alcanzando niveles de 3,9 mg/dL y 2,86 respectivamente, al 10° día post operatorio, mientras que un segundo paciente presentó signos clínicos compatibles con disfunción hepática con ascenso de bilirrubina total hasta 5,2 mg/dL e INR normal, tras el cual ambos casos evolucionan con mejoría clínica progresiva y completa normalización de las alteraciones bioquímicas.

Otras variables del perfil hepático como fosfatasas alcalinas y GGT, no presentaron variaciones significativas durante el periodo de estudio, mientras que la bilirrubina directa presentó similar comportamiento a bilirrubina total, pero dentro de valores de normalidad.

#### 4. Resultados clínicos de pacientes sometidos a ALPPS y sobrevida

La morbilidad general fue evaluada de acuerdo a la clasificación de Clavien Dindo de complicaciones quirúrgicas. Un total de 20 complicaciones se presentaron en 7 pacientes (63,6%,  $n=7/11$ ), siendo el 80% (16/20) clasificadas como tipo I o II, es decir, éstas requirieron sólo de manejo médico sin procedimientos invasivos asociados para su resolución (Tabla 4).

Complicaciones de mayor gravedad tipo IIIb –que requieren reintervención quirúrgica para su resolución-, se observó en dos pacientes, uno de los cuales presentó al 5° día posterior al segundo tiempo del ALPPS una peritonitis difusa secundaria a perforación de íleon, mientras que el segundo caso cursó con un cuadro de obstrucción intestinal a nivel de colon

descendente secundario a lesión estenosante del tumor primario aún no resecado, tras el primer tiempo operatorio del ALPPS.

Complicaciones	Pacientes (n, %)
I: Oliguria, injuria renal aguda, atelectasia, delirium hipoactivo	5 (45,5%)
II: Derrame pleural, ascitis, anemia post operatoria, colección intraabdominal, diarrea por <i>C. difficile</i> , infección herida operatoria, sepsis por catéter, trombosis vena cava superior, íleo post operatorio (NPTC), colestasia transitoria, SIRS	5 (45,5%)
III	
IIIa: Derrame pleural derecho tardío	1 (9,1%)
IIIb: Peritonitis difusa (perforación de íleon), obstrucción intestinal por tumor primario	2 (18,2%)
IV	
IVa: Insuficiencia hepática aguda post operatoria (reversible)	2 (18,2)
IVb: <i>Disfunción multiorgánica</i>	0 (0%)
V: <i>Muerte</i>	0 (0%)

NPTC: nutrición parenteral total; SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

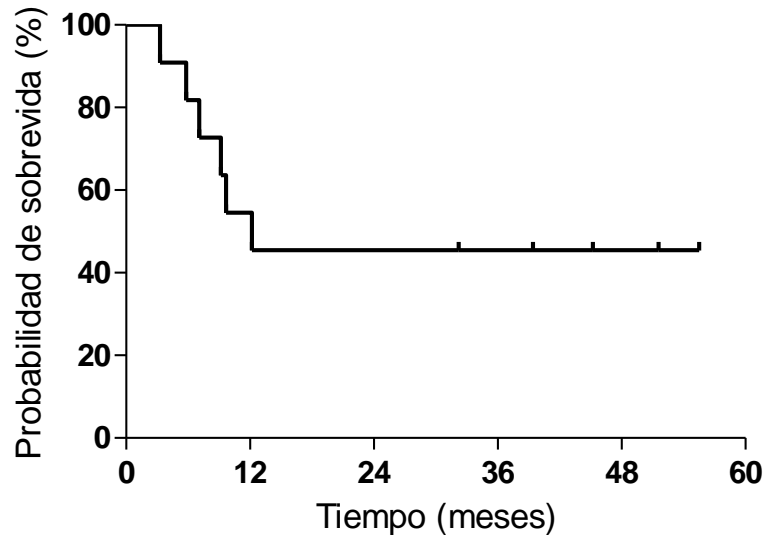
**Tabla 4.** Complicaciones de acuerdo a la clasificación de Clavien Dindo de morbilidad quirúrgica.

La insuficiencia hepática post operatoria tipo B (clasificada como complicación IVa de Clavien Dindo ante el potencial riesgo vital que implica), se presentó en dos pacientes, los que manifestaron signos clínicos de disfunción hepática post operatoria, sin embargo, ambos casos tuvieron favorable evolución con regresión clínica completa, sin representar un retardo para la realización del segundo tiempo resectivo, siendo 7 y 14 días respectivamente, ni una significativa prolongación en la estadía hospitalaria.

La complicación tipo V, es decir, el evento muerte intrahospitalaria, no se observó en esta serie de pacientes sometidos a ALPPS. Así, la media de sobrevida global alcanzó  $24,7 \pm 20,3$  meses, con una probabilidad de sobrevida de 54,5% a 10 meses y 45,4% a dos años, manteniéndose tal sobrevida a 55 meses de seguimiento (Figura 23).



Variable	Media (DE)
Tasa de resecabilidad, n (%)	11 (100%)
Mortalidad a 30 días, n (%)	0 (0%)
Mortalidad intrahospitalaria, n (%)	0 (0%)
Mortalidad a 90 días, n (%)	0 (0%)
Media de sobrevida meses, media (DE)	24,7 ( $\pm$ 20,3)
<b>Márgenes quirúrgicos</b>	
• R disponible, n	10/11
• Resección completa (R0)	7 (63,6%)
• Resección incompleta (R1/R2), n (%)	2 (18,2%)
• Resección no evaluable (Rx)	1 (9,1%)

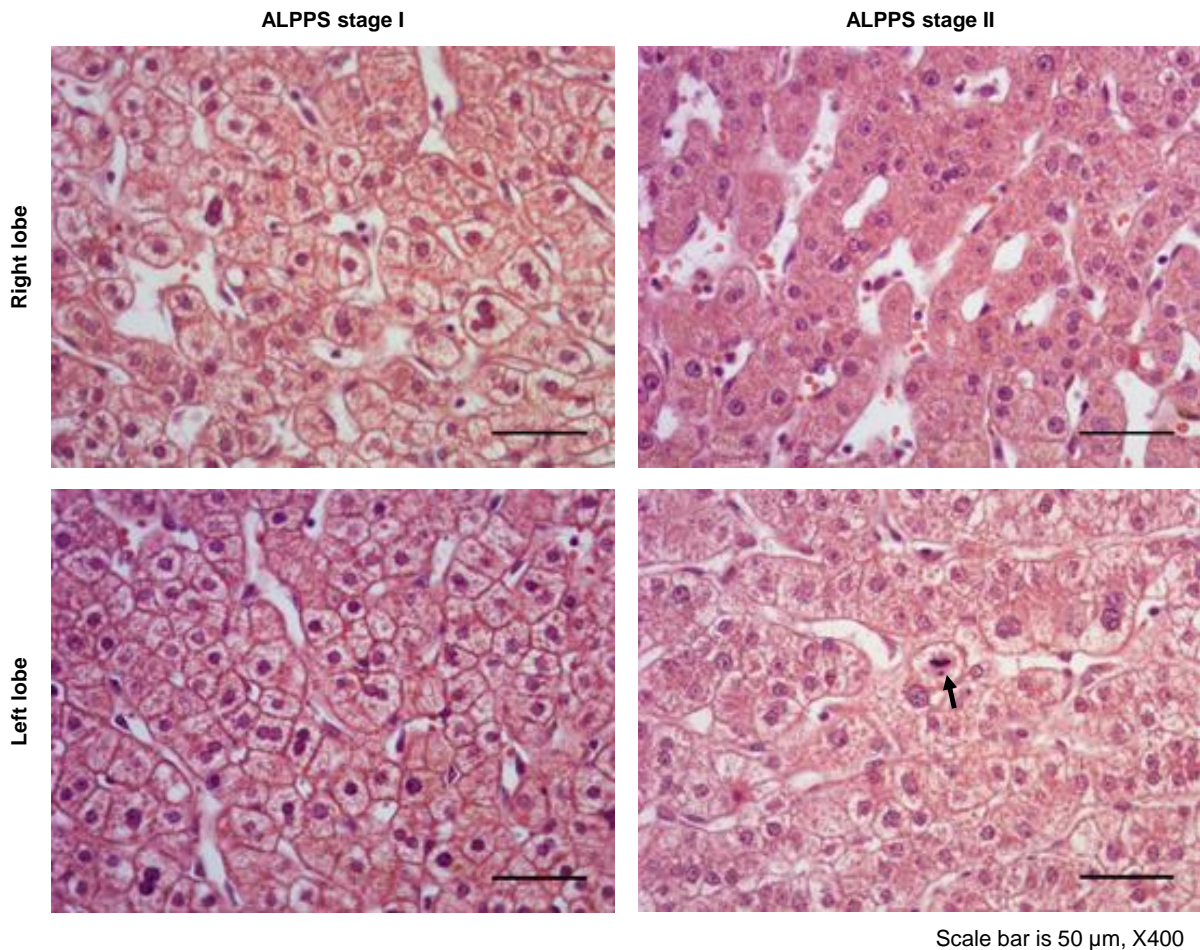


**Figura 23.** Principales resultados post operatorios de pacientes tratados mediante técnica de ALPPS y curva de sobrevida.

##### 5. Cambios histológicos y marcadores de proliferación celular

Con el fin de obtener una aproximación a los eventos que expliquen la significativa ganancia volumétrica tras la realización del ALPPS en este grupo de pacientes, se efectuaron al igual que en el modelo experimental en ratas, estudios histológicos con tinción de hematoxilina-eosina (HE) e inmunohistoquímica para Ki-67, éste último, conocido marcador

de proliferación celular. De esta manera, se observa en muestras con tinción de HE obtenidas en el primer tiempo operatorio de tejido hepático deportalizado –lóbulo hepático derecho-, así como en el tejido hepático remanente –lóbulo hepático izquierdo-, una configuración tisular normal con sistemas portas indemnes y sinusoides hepáticos preservados (Figura 24).



Scale bar is 50  $\mu$ m, X400

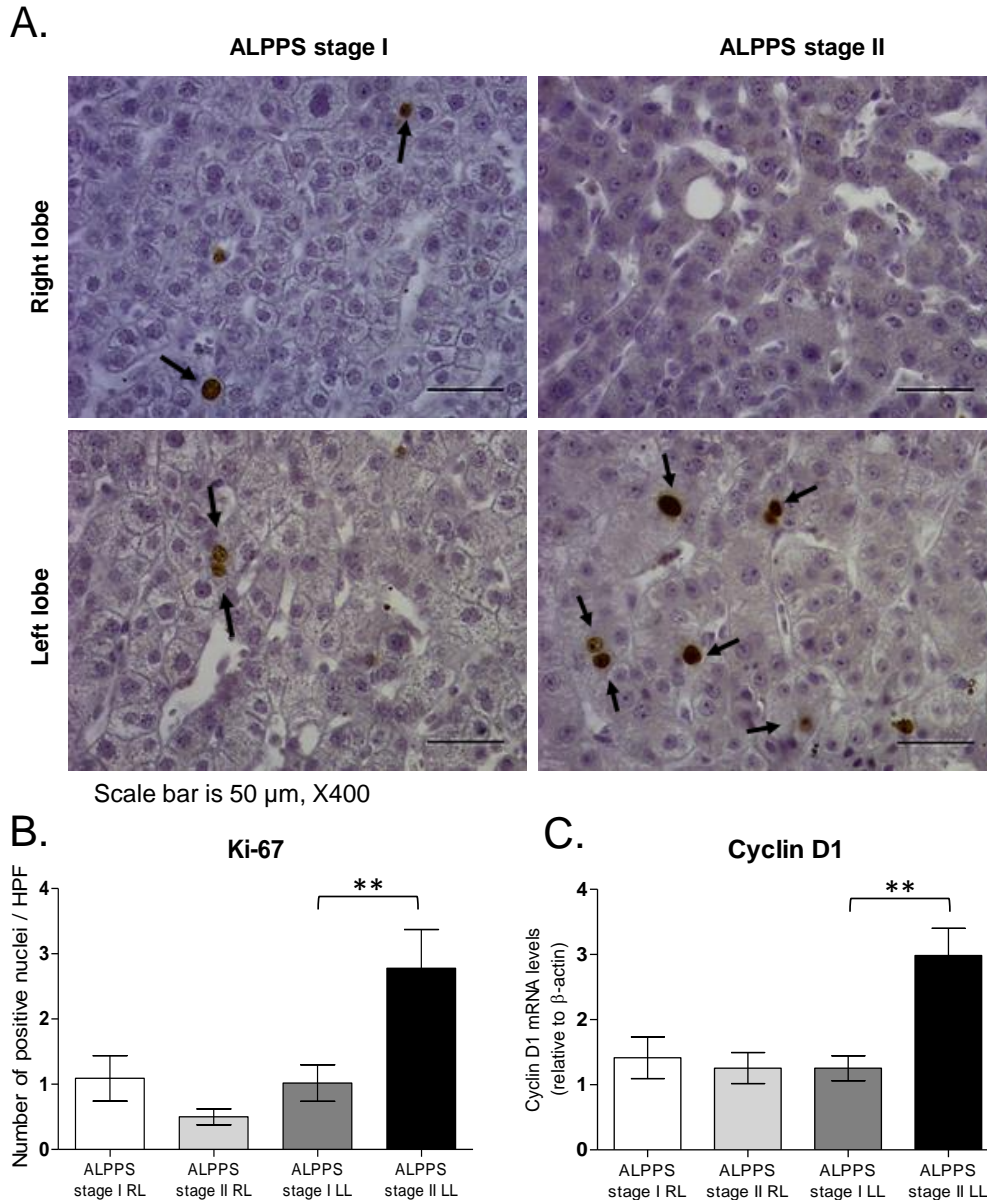
**Figura 24.** Estructura tisular de muestras de tejido hepático deportalizado (*Right lobe*) y de tejido hepático remanente (*Left lobe*) previo a primer y segundo tiempo operatorio de pacientes sometidos a ALPPS. Fotografías de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina en campos de mayor aumento (400X) de un paciente. Escala corresponde a 50  $\mu$ m. Flecha indica figura mitótica en muestra de remanente hepático al segundo tiempo operatorio.

A su vez, en muestras histológicas HE obtenidas al segundo tiempo operatorio, se observa desde el punto de vista cualitativo, una preservación de la estructura tisular global en muestras de tejido deportalizado, con focos microscópicos de necrosis hepatocelular aislados,

mientras que la estructura morfológica del resto de los hepatocitos no presenta grandes cambios. No obstante, en muestras de tejido hepático remanente, se conservan los sistemas porta y sinusoides hepáticos asociados a hepatocitos que muestran pequeñas vesículas citoplasmáticas sugerentes de cierto grado de esteatosis, asociadas a la presencia de figuras mitóticas con mayor frecuencia (Figura 24).

Así, para una valoración más precisa de la respuesta proliferativa tisular, se cuantificó en 10 campos de mayor aumento, el número de células con núcleos positivos para Ki-67 tanto en muestras de tejido hepático deportalizado –en todos los casos correspondiente al lóbulo hepático derecho-, como del tejido hepático remanente –lóbulo hepático izquierdo-, obtenidos tanto en el primer como segundo tiempo operatorio de ALPPS. De esta manera, se observa que en el tejido hepático del lóbulo derecho no existen cambios significativos entre la primera y segunda etapa quirúrgica ( $1,31 \pm 1,16$  vs  $0,57 \pm 0,4$  células Ki-67 (+)/CMA respectivamente;  $p > 0,05$ ), mientras que el tejido hepático remanente muestra un significativo aumento en el recuento de células positivas para Ki-67 en el segundo tiempo quirúrgico, alcanzando  $3,02 \pm 1,8$  vs  $1,14 \pm 0,98$  células Ki-67 (+)/CMA en la primera etapa del ALPPS ( $p < 0,01$ ) (Figura 25).

Adicionalmente, niveles de mRNA del gen ciclina D1 –*Cyclin D1*-, molécula necesaria para la transición de fases G1/S del ciclo celular, y por tanto marcador precoz de proliferación celular, presenta en el tejido hepático remanente un significativo aumento en sus niveles al segundo tiempo operatorio versus el primer tiempo quirúrgico ( $2,985 \pm 1,319$  vs  $1,254 \pm 0,5719$  respectivamente;  $p < 0,01$ ), mientras que no se observan cambios significativos en los niveles de mRNA de ciclina D1 en tejido hepático deportalizado entre ambos tiempos de estudio ( $p > 0,05$ ) (Figura 25).



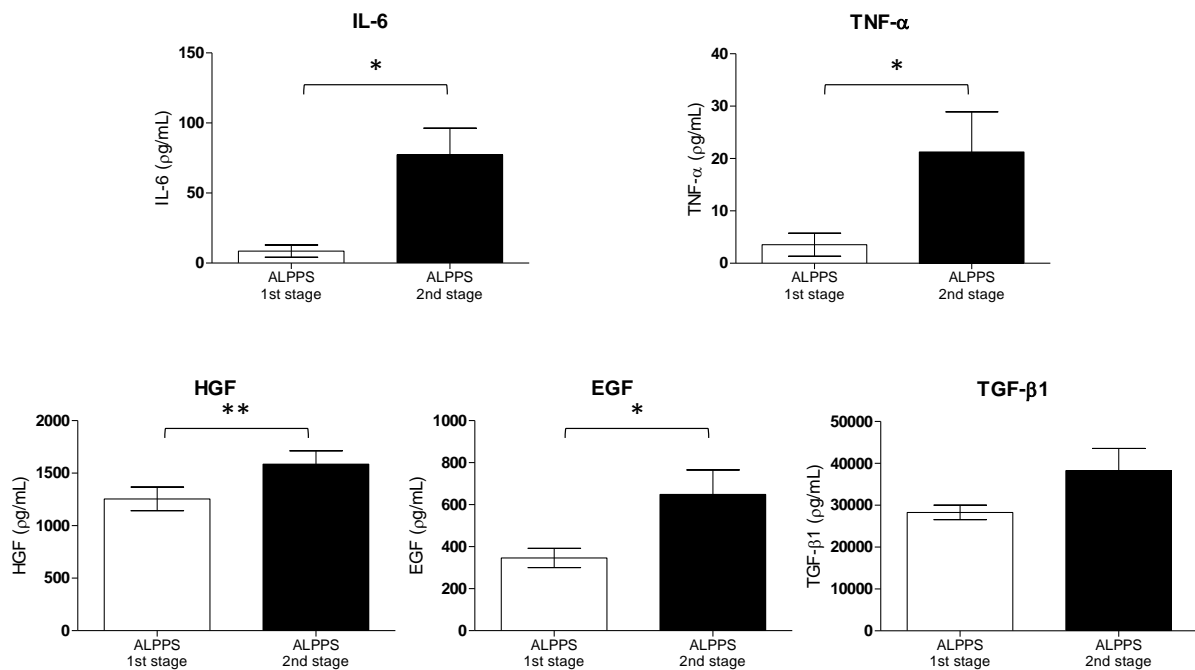
**Figura 25.** Parámetros de proliferación celular en muestras de tejido hepático deportalizado y remanente previo a primera y segunda etapa operatoria de pacientes sometidos a ALPPS.

A. A la izquierda, se observan cortes histológicos (400X) de tejido hepático deportalizado (*Right lobe*) y remanente (*Left lobe*) de un paciente previo a primer y segundo tiempo operatorio de ALPPS. Flecha indica núcleos de hepatocitos Ki-67 (+). Escala corresponde a 50  $\mu$ m. B. Cuantificación de núcleos de hepatocitos Ki-67 (+) en muestras de tejido deportalizado (RL) y remanente hepático (LL) en primer y segundo tiempo operatorio de todos los pacientes sometidos a ALPPS (\*\*  $p < 0,01$ ). C. Expresión de ciclina D1 en muestras de tejido deportalizado (RL) y no deportalizado (LL) en ambas etapas de ALPPS (\*\*  $p < 0,01$ ).

## 6. Parámetros de inflamación y progresión en regeneración hepática

En muestras serológicas de los pacientes sometidos a ALPPS obtenidas en el primer y segundo tiempo operatorio, se efectuaron mediciones de marcadores de progresión en

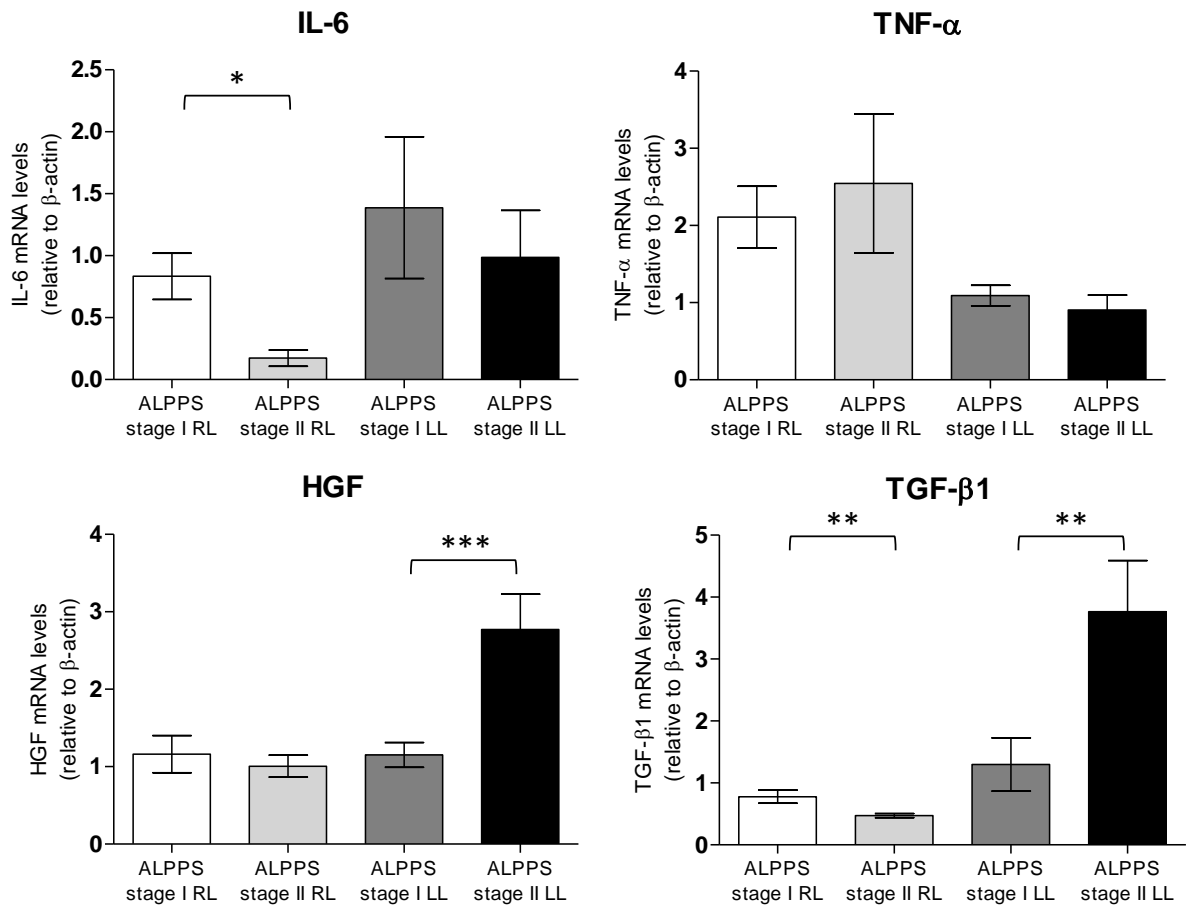
regeneración hepática. Inicialmente, se midieron marcadores proinflamatorios involucrados en la fase inicial de la respuesta regenerativa hepática, objetivándose un significativo aumento en los niveles plasmáticos de IL-6 desde  $8,53 \pm 12,32 \text{ } \mu\text{g/mL}$  a  $77,34 \pm 60,18 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0,05$ ; mientras que para TNF- $\alpha$  se cuantificó un incremento significativo de sus niveles plasmáticos desde  $3,5 \pm 6,59 \text{ } \mu\text{g/mL}$  a  $21,26 \pm 24,23 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0,05$  hacia el segundo tiempo operatorio (Figura 26). Sin embargo, estos resultados no se corresponden con los niveles de mRNA medidos en tejido hepático remanente –lóbulo hepático izquierdo- para los genes de IL-6 y TNF- $\alpha$ , donde no se observan cambios significativos entre ambos tiempos quirúrgicos ( $p > 0,05$ ) (Figura 27).



**Figura 26.** Niveles serológicos de marcadores de inflamación y progresión en regeneración hepática previo a primer y segundo tiempo operatorio de pacientes sometidos a ALPPS. Se muestra comparaciones estadísticas entre ambas etapas (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). La ausencia de barra de significancia entre las etapas indica  $p > 0,05$ .

Adicionalmente, se cuantificaron los niveles serológicos del marcador de regeneración hepática HGF, identificándose un significativo aumento en sus niveles plasmáticos, variando desde  $1255 \pm 339,1 \text{ } \mu\text{g/mL}$  en la primera etapa de ALPPS a  $1586 \pm 379,4 \text{ } \mu\text{g/mL}$  en el segundo

tiempo resectivo,  $p < 0,01$  (Figura 26). Tal observación es compatible con las mediciones en los niveles de mRNA del gen de HGF efectuadas en muestras de tejido hepático remanente no deportalizado, donde existe un significativo incremento hacia el segundo tiempo operatorio, duplicándose la expresión génica de HGF comparado al primer tiempo quirúrgico del ALPPS ( $p < 0,001$ ) (Figura 27).



**Figura 27.** Expresión de genes asociados a inflamación y progresión en regeneración hepática previo a primera y segunda etapa de ALPPS. Cuantificaciones de mRNA realizadas en tejido hepático deportalizado (RL) y remanente (LL), (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Otros mediadores involucrados en la respuesta regenerativa hepática fueron medidos, tales como TGF- $\beta$ , cuyos niveles se incrementan conforme transcurre el fenómeno de regeneración, llegando a un nivel máximo que se ha asociado al término del proceso [78]. Así,

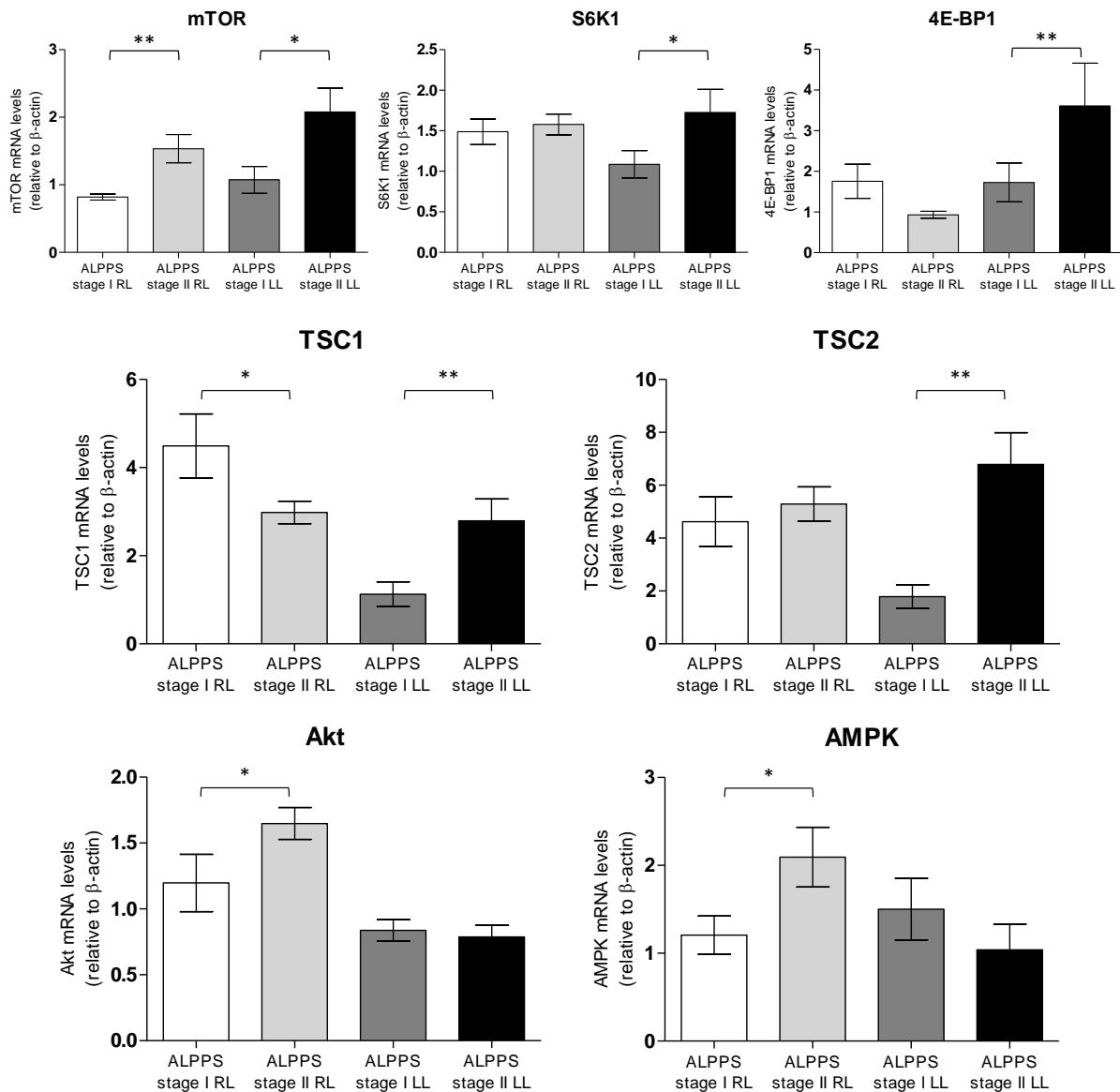
en este grupo de pacientes se observa una tendencia al aumento de los niveles serológicos de TGF- $\beta$  en la segunda etapa del ALPPS respecto al primer tiempo quirúrgico, desde  $28282 \pm 5167$   $\mu\text{g/mL}$  a  $38262 \pm 15894$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, aunque sin diferencias significativas,  $p > 0,05$  (Figura 26). No obstante, a nivel de expresión génica, existe un significativo incremento en los niveles de mRNA de TGF- $\beta 1$  y TGF- $\beta 2$  en muestras de tejido hepático remanente al segundo tiempo operatorio ( $p < 0,01$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) (Figura 27).

Finalmente, se cuantificaron niveles de EGF plasmático el que aumenta en forma significativa en el segundo tiempo operatorio en relación a valores pre ALPPS ( $648,9 \pm 369,8$  vs  $346,5 \pm 137,8$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ) (Figura 26).

#### 7. Activación de la vía de señalización de mTOR

Con el fin de obtener una aproximación a los eventos moleculares implicados en la respuesta regenerativa hepática, de forma similar a los estudios efectuados en ratas, se cuantificó el nivel de expresión de genes involucrados en la regulación de la actividad de mTOR. Así, en esta serie de pacientes tratados mediante ALPPS, se observa un significativo aumento en los niveles de mRNA de mTOR en muestras de tejido hepático remanente tomadas en el segundo tiempo operatorio respecto a la condición pre ALPPS ( $2,079 \pm 1,112$  vs  $1,073 \pm 0,594$  respectivamente;  $p < 0,05$ ) (Figura 28), que a su vez se condice con un significativo incremento en los niveles de expresión de genes río abajo a la acción de mTOR, tales como S6K1 y 4E-BP1 (Figura 28). A su vez, en el tejido hepático remanente, se observa en muestras tomadas en el segundo tiempo resectivo del ALPPS, una tendencia hacia la reducción en los niveles de mRNA de la subunidad  $\alpha$  catalítica de AMPK, aunque sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), situación similar a la presentada en cuanto a la expresión de mRNA del gen Akt ( $p > 0,05$ ).

Como se indicó previamente, la modulación de la activación de mTOR se encuentra regulada por el heterodímero conformado por dos productos génicos TSC1 y TSC2, observándose en el tejido hepático remanente un significativo aumento en los niveles de mRNA de ambos genes en el segundo tiempo operatorio (Figura 28).



**Figura 28.** Expresión de genes relacionados a la vía de señalización de mTOR previo a primera y segunda etapa de ALPPS. Cuantificaciones de mRNA realizadas en tejido hepático deportalizado (RL) y remanente (LL), (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



Se efectuaron las mismas determinaciones en muestras de tejido hepático deportalizado, evidenciándose en el segundo tiempo operatorio un significativo incremento en los niveles de mRNA de mTOR ( $p < 0,01$ ), sin embargo no hubo cambios en los niveles de mRNA de los efectores río abajo S6K1 ni 4E-BP1 ( $p > 0,05$  en ambos casos) (Figura 28). Por otro lado, a diferencia de lo observado para el tejido hepático remanente no deportalizado, las muestras de tejido hepático del lóbulo derecho presentaron un significativo aumento tanto en los niveles de mRNA de la subunidad  $\alpha$  catalítica de AMPK ( $p < 0,05$ ), como en el nivel de expresión de Akt ( $p < 0,05$ ). A su vez, la expresión del gen TSC1 presentó una significativa reducción ( $p < 0,05$ ), a la vez que los niveles de mRNA de TSC2 no presentó variaciones en el segundo tiempo operatorio ( $p > 0,05$ ) (Figura 28).

## VII. Discusión

El ALPPS es una nueva técnica quirúrgica que permitiría optimizar en forma más rápida el volumen del remanente hepático en pacientes en que se considera insuficiente y que requieren de una hepatectomía extendida, particularmente en patología oncológica. En la serie de pacientes presentada en este trabajo, el incremento volumétrico relativo observado post ALPPS, alcanzó un  $111,6 \pm 63,47\%$  en un plazo de 9 días. Estos resultados son compatibles con los reportes iniciales de ALPPS [49, 53, 54], así como con la primera gran serie de pacientes publicada por el registro internacional de ALPPS (n=202), que muestra un aumento de un 80% de volumen en una media de 7 días [66].

El incremento volumétrico de nuestra casuística, que supera ampliamente los resultados obtenidos con procedimientos clásicos de embolización o ligadura portal preoperatoria, establecido en aproximadamente 30-35% en 6-8 semanas [37, 39, 40], ocurrió a pesar de que la mayoría de los pacientes (90,9%) fueron sometidos a múltiples ciclos de quimioterapia previo a ALPPS, mientras que más del 50% de la serie tenía una edad >60 años, siendo ambos factores asociados a una menor ganancia volumétrica del remanente y a una menor cinética de crecimiento [66].

A excepción de un paciente de esta serie, todos presentaban un remanente insuficiente previo a la intervención o en niveles muy límites, variando la relación del remanente hepático/masa corporal total precirugía de 0,4% a 0,81%, superando en todos los casos el límite de suficiencia (0,5%) para efectuar la hepatectomía –el segundo tiempo resectivo de ALPPS- en forma segura, así tales resultados reproducen los mostrados en la serie de Schnitzbauer y col. cuyo índice aumentó desde 0,38% a 0,61% [49]. Adicionalmente, la media de incremento de volumen absoluto fue  $290,3 \pm 107,8$  mL, lo que equivale a un incremento

volumétrico diario de  $34,43 \pm 17,27$  mL/día, similar a lo publicado por Schadde y col. de 34,8 mL/día [55]. Es decir, esta serie de pacientes reproduce fielmente los niveles de ganancia volumétrica estudiada en series reportadas previamente.

La implicancia práctica que deriva de los resultados señalados, es que el aumento de volumen del remanente es mayor y en un tiempo significativamente menor al obtenido con las técnicas clásicas de embolización/ligadura portal preoperatoria o mediante técnicas de hepatectomía en dos tiempos; así la totalidad de los pacientes incluidos en este estudio, completó la segunda etapa resectiva (100%), en una mediana de tiempo de 14 días, lo que indudablemente representa un avance respecto a las distintas técnicas de hepatectomías antes señaladas, donde 1/3 de los casos no logra llegar al tiempo resectivo, mientras que en aquellos pacientes en que se efectúa la hepatectomía, ocurre en un periodo medio de 8 semanas [34, 36, 37, 39, 40, 43].

Un trabajo comparativo de ALPPS versus series históricas de pacientes sometidos a embolización/ligadura portal, muestra tasas de resecabilidad de 96% a 30 días mediante ALPPS, en comparación a sólo un 12% del grupo de ligadura/embolización portal en el mismo periodo [55]. Nuestros resultados muestran que el 90,9% ( $n=10/11$ ) de los casos, completó el segundo tiempo resectivo antes de los 30 días, mientras que el único caso que no se sometió a la hepatectomía en el tiempo señalado, fue debido a complicaciones no hepáticas derivadas del tumor primario –que al momento de la cirugía estaba controlado con quimioterapia sistémica-, evolucionando con una obstrucción intestinal tumoral, cuyo tratamiento derivó en un retardo del tiempo resectivo hepático. De esta manera, tales resultados apoyan la evidencia que indica que ALPPS permitiría la resección de pacientes previamente considerados irresecables o marginalmente resecables, ampliando las posibilidades de resección y tratamiento efectivo en

pacientes terapéuticamente límites, en un marco de tiempo ajustado a las necesidades oncológicas que se presentan en este escenario clínico.

Si bien, la técnica de ALPPS ofrece ventajas en cuanto a ganancia volumétrica frente a otras modalidades terapéuticas, la marcada morbimortalidad comunicada en las series iniciales ha limitado la aceptación de esta estrategia quirúrgica. En nuestra serie de pacientes, las complicaciones se presentaron en 7 casos (63,6%, n=7/11); sin embargo, el 80% de ellas fueron complicaciones de baja morbilidad –tipo I o II de Clavien Dindo-, presentando un impacto mínimo en la evolución clínica post operatoria. A su vez, los pacientes que presentaron complicaciones requiriendo de manejo invasivo –tipo III de Clavien Dindo-, fue a consecuencia de complicaciones no hepáticas o no derivadas directamente de la intervención en el hígado, siendo sometidos a reexploración quirúrgica un caso por obstrucción intestinal secundaria al tumor primario, mientras el segundo por peritonitis secundaria a perforación de íleon distal.

En este sentido, el espectro de complicaciones observadas en esta serie varía significativamente en comparación con las publicadas en estudios previos, donde se ha reportado la sepsis y las filtraciones biliares como las principales causas de morbilidad quirúrgica en ALPPS [51, 55, 61]. La sepsis post operatoria intraabdominal observada en este contexto, se ha asociado a la significativa desvascularización del segmento IV, el que en ocasiones queda privado tanto de flujo venoso portal como arterial tras la transección del parénquima, aumentando el riesgo de necrosis isquémica e infección secundaria [62]. No obstante, si bien en nuestra casuística durante el segundo tiempo operatorio se ha observado cierto grado de necrosis y/o tejido de aspecto desvitalizado, tanto en el parénquima deportalizado como en el remanente en relación a los límites de la transección, esto no ha

derivado en el desarrollo de abscesos hepáticos ni colecciones sépticas perihepáticas que hayan precisado de drenaje o reintervención. A su vez, las filtraciones biliares y/o biliomas, cuya incidencia alcanza el 24% en distintas series de ALPPS [49, 55], no fue una complicación relevante en nuestra serie, observándose solo en un caso, como hallazgo en el segundo tiempo operatorio y resuelto durante el mismo acto quirúrgico.

Algunos autores han planteado que el remanente hepático rápidamente regenerado manifestaría importantes insuficiencias funcionales, sin embargo, esto no se condice con la baja tasa de insuficiencia hepática observada tanto en reportes post ALPPS [49], como a lo determinado en nuestra propia casuística. Ninguno de los casos de nuestro estudio presentó los criterios de insuficiencia hepática post operatoria evaluados al 5° día –“Criterios 50/50”- [27], mientras que los dos pacientes que presentaron signos clínicos y de laboratorio luego de ese plazo, evolucionaron favorablemente, precisando de tratamiento médico de soporte con medidas convencionales no invasivas. Es decir, a pesar de considerar esta complicación como tipo IV de Clavien Dindo por la potencial gravedad que su diagnóstico implica, su curso clínico fue benigno, posiblemente en el contexto de una disfunción hepática transitoria tras una hepatectomía mayor, lo que se manifiesta en la mayoría de los casos mediante parámetros de función y/o daño hepatocelular con variaciones perioperatorias esperables, retornando rápidamente a rangos de normalidad.

Los resultados clínicos así obtenidos en esta serie de casos, se corresponden a su vez con una tasa de mortalidad perioperatoria de 0% (n=0/11), lo que se encuentra en un nivel significativamente menor respecto a otras experiencias en ALPPS –con mortalidad publicada de hasta un 28%- [49, 53, 54, 57], así como a la serie de n=202 pacientes previamente señalada, donde se publicó un 9% de mortalidad a 90 días [66]. Desde luego, nuestros

resultados son a partir de una serie de pacientes aún escasa, sin embargo, éstos permiten establecer cierto perfil de riesgo del procedimiento y realizar comparaciones frente a otros reportes. En este sentido, se ha asociado ciertos factores de riesgo a complicaciones post ALPPS, entre ellos, la edad >60 años, pacientes con metástasis de origen no colorrectal, la transfusión intraoperatoria de hemoderivados y la duración del primer tiempo operatorio >6 horas [66].

En nuestra serie de pacientes, la maniobra de Pringle –oclusión del pedículo portal para control de hemorragia intraoperatoria- en el primer tiempo operatorio del ALPPS, que a su vez, se ha asociado a una menor ganancia de volumen del remanente [66], se utilizó de forma excepcional, y sólo 3 pacientes presentaron sangrado significativo requiriendo transfusión intraoperatoria de glóbulos rojos, mientras que la duración del primer tiempo quirúrgico tuvo una media de 4,3 horas. A su vez, la media de edad de  $58,8 \pm 8,04$  años, junto a pacientes que en su mayoría presentaba metástasis hepáticas de cáncer colorrectal, permiten validar la primera serie significativa de casos consecutivos estudiados en forma prospectiva a nivel nacional con resultados clínicos reproducibles y avalados en la literatura internacional.

El número total de pacientes incluidos en este informe y el poco tiempo de seguimiento, resulta insuficiente como para efectuar análisis concluyentes respecto a los resultados oncológicos. No obstante, es importante mencionar que la sobrevida en torno al 50% observada a 12 meses, así como casos de nuestra serie con sobrevidas de más de 55 meses, apoyan la realización de esta técnica en pacientes no considerados candidatos a hepatectomía convencional, lo que implica aceptar –hasta el momento-, que existe un grupo de pacientes que se beneficia de este procedimiento, especialmente aquellos <60 años y con metástasis de cáncer colorrectal, en quienes se ha publicado sobrevidas a 1 y 2 años de 88% y

74% respectivamente [66], comparables a los obtenidos con embolización/ligadura portal combinado a hepatectomía en dos tiempos en similar grupo de pacientes [43, 133].

Con el objetivo de estudiar los fenómenos biológicos implicados en la respuesta regenerativa observada en pacientes, se estandarizó un modelo experimental en ratas, que permitió reproducir exitosamente la técnica quirúrgica. En este modelo se observó un aumento de la masa hepática del remanente significativamente mayor en comparación con todos los grupos controles, y en particular respecto al modelo de ligadura portal, siendo esto a su vez logrado en un marco temporal menor; es decir, este modelo reproduce los efectos comunicados en pacientes y sus resultados son similares a los publicados por otros autores en modelos experimentales [126]. A su vez, es importante destacar que la transección por sí misma no constituye un estímulo prorregenerativo hepático, toda vez que no induce cambios de masa significativos en el remanente en comparación con los animales sometidos a cirugía simulada –*sham*–.

Nuestros resultados sugieren que el aumento de volumen del remanente observado en humanos, ocurre a expensas de tejido hepático hiperplásico, ya que se observó un aumento significativo en el número de núcleos de hepatocitos positivos para Ki-67, conocido marcador de proliferación celular, lo que representa el primer resultado reportado en una serie de pacientes que apoya esta hipótesis. Así, existe una correlación entre el aumento de volumen del remanente e índices de proliferación celular en el tejido hepático, lo que confirma la percepción de que ALPPS efectivamente induce la regeneración de masa hepatocelular.

Complementariamente, en nuestro modelo experimental de ALPPS se obtuvieron resultados similares, objetivándose un aumento significativo en el índice mitótico durante las primeras 72 hrs en comparación con los grupos *sham* y transección, aunque esta diferencia no

fue significativa en comparación con el grupo ligadura portal (Figura 11). Esta última observación, podría deberse a que la mitosis es un fenómeno transitorio y relativamente rápido que representa, desde el punto de vista temporal, una fracción menor del ciclo celular, por lo que las diferencias buscadas pueden requerir grupos experimentales más numerosos. Para contrastar estos datos, se utilizó el marcador de proliferación celular Ki-67, debido a que se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular y está ausente en células en reposo proliferativo [134, 135]. A través de este marcador, se obtuvo una respuesta proliferativa significativamente mayor en ratas sometidas a ALPPS comparada con todos los grupos controles, lo que sugiere que ALPPS favorece un reclutamiento precoz y mayor de células que ingresan a G1 (Figura 12). Esto es concordante con el aumento significativo de la expresión de ciclina D1 en muestras de tejido hepático remanente humano, debido a que su actividad está asociada a la entrada de células a las fases activas del ciclo celular [136] (Figura 25).

En cuanto a parámetros de función y/o daño hepatocelular, las ratas presentan tanto en grupo ALPPS como ligadura portal, un incremento significativo en los niveles de transaminasas a las 24 hrs con rápida normalización hacia el tercer día post operatorio (Figura 9), tal comportamiento es similar al observado en los estudios del perfil hepático de los pacientes sometidos a ALPPS. Los animales sometidos a transección presentan un alza leve de GOT y GPT, no significativa en comparación con *sham*, lo que sugiere que el aumento de transaminasas sería principalmente por la isquemia del tejido hepático deprivado de flujo portal, más que por la transección *per se*.

Los parámetros de función hepática en las ratas sometidas a ALPPS muestran un significativo incremento de INR respecto a grupos controles de transección y *sham* a las 24 hrs, si bien rápidamente se corrige a la situación basal, persistiendo en todo momento dentro



de rangos de normalidad. Tal situación es similar a la observada en muestras plasmáticas humanas, por lo que ALPPS tanto en el modelo experimental como en humanos, no induce un deterioro de la función hepática global, lo cual representa un objetivo tácito fundamental del procedimiento que justifica su realización. Es evidente, que en nuestro modelo animal no seguimos la función hepática tras un segundo tiempo resectivo –no es el objetivo del estudio-, sin embargo, es importante destacar la inexistencia de insuficiencia hepática post operatoria en nuestro modelo en ratas, toda vez que su aparición en 2 animales se debió a defectos técnicos intraoperatorios, siendo nula su incidencia en el resto de las ratas correctamente operadas.

En modelos animales de ALPPS se ha observado una respuesta inflamatoria significativa tanto a nivel sistémico como en el tejido remanente, lo que se ha asociado a una respuesta regenerativa mayor [137]. El proceso inflamatorio, según modelos clásicos de regeneración, es un estímulo esencial en el inicio de la respuesta proliferativa [72-74]. En las ratas de nuestro modelo experimental de ALPPS se observó un aumento significativo en los niveles de IL-6 séricos a las 72 hrs respecto a los grupos controles, siendo de una magnitud mayor a la suma de los niveles plasmáticos obtenidos en ratas sometidas a ligadura portal o transección sola. Es decir, la transección que si bien no genera un daño hepatocelular tan significativo –cambios mínimos en niveles de transaminasas- y nula variación en la masa hepática del remanente, cuando se asocia a las ligaduras portales –es decir, ALPPS- induce una significativa respuesta proinflamatoria, eventualmente sinérgica, que deriva en un mayor incremento de masa hepática.

Sin embargo, el rol de la respuesta inflamatoria mediada por las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en el fenómeno regenerativo post hepatectomía parcial se ha asociado a las etapas más precoces del proceso, particularmente en la fase de iniciación o *priming*, donde los hepatocitos

adquieren alta reactividad a moléculas mitógenas [72, 74], por lo que la respuesta inflamatoria sistémica observada debería asociarse a una respuesta inflamatoria tisular en forma precoz y con un efecto local. Así, tales inferencias fueron confirmadas en nuestro modelo, donde se encontró un aumento significativo del mensajero de IL-6 en el tejido hepático remanente de las ratas sometidas a ALPPS, que aunque no varía respecto al grupo ligadura portal a las 24 hrs, sí se establecen diferencias entre ambas al tercer día post operatorio (Figura 13). Con el objetivo de evaluar la naturaleza de esta respuesta inflamatoria precoz, se efectuaron estudios histológicos con tinción inmunohistoquímica específica para mieloperoxidasa, a fin de determinar el grado de infiltración de polimorfonucleares posiblemente relacionados con este proceso. Los resultados obtenidos no permitieron establecer diferencias significativas en el grado de infiltración leucocitaria en el espesor del parénquima regenerado entre los distintos grupos experimentales, sin embargo, tanto en grupo sometido a ALPPS como a transección, se observa una importante reacción inflamatoria caracterizada por un significativo infiltrado de leucocitos adyacente a la zona del tejido hepático en el que se realizó la partición, asociado a importante depósito de fibras de colágeno. Tal observación se asocia al hecho de que las ratas sometidas a transección presentan una llamativa tendencia a incrementar la expresión de IL-6 en forma precoz, aunque sin diferencias significativas respecto al grupo *sham*, luego del cual ocurre una rápida normalización hasta la supresión y bloqueo de la expresión génica de IL-6 (Figura 13).

En conjunto, estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria observada en ratas ALPPS, es de naturaleza bimodal y sostenida, con una fase precoz y de efecto muy local, secundario a la transección del tejido hepático, cuyo daño hepatocelular implicaría la liberación de antígenos que a su vez inducirían una significativa infiltración leucocitaria local,

seguida de una respuesta inflamatoria sistémica en un tiempo posterior. Esta segunda fase sistémica de inflamación, se debería a los efectos de la deprivación sostenida del flujo portal, que en el caso de las ratas ALPPS, dada la sección de colaterales intrahepáticas por la transección, favorece la generación de focos de necrosis en el tejido deportalizado, lo que perpetúa una respuesta inflamatoria con expresión a nivel sistémico.

Esta última conclusión, a su vez se fundamenta, en que muestras humanas de tejido deportalizado, obtenidas al segundo tiempo operatorio, evidencian focos de necrosis tisular, lo que se corresponde con la respuesta proinflamatoria objetivada a nivel sistémico en tales pacientes, a través de un significativo aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$  tras la realización del primer tiempo operatorio (Figura 26). Sin embargo, no se observó un aumento en la expresión de IL-6 ni de TNF- $\alpha$  en el tejido hepático remanente ni deportalizado obtenido en este mismo tiempo resectivo, probablemente debido a que la fase inflamatoria precoz y con efecto local, en el caso de los pacientes, ocurrió en tiempos previos de los cuales no se obtuvo muestras.

Adicionalmente, la respuesta proinflamatoria sistémica inducida post ALPPS en pacientes, es concordante con los niveles séricos de mediadores que representan un subrogante del fenómeno de regeneración hepática, tales como HGF y EGF [76, 77], mientras que TGF- $\beta$  considerado un indicador de término del proceso [78], muestra una tendencia al incremento que no alcanza a ser significativo en el segundo tiempo operatorio en humanos, posiblemente debido a que el fenómeno regenerativo aún se encuentra en curso.

En el caso del modelo experimental, si bien no se observaron cambios en los niveles de HGF sérico, el aumento significativo en su expresión en el tejido remanente en ALPPS y ligadura portal, sugieren que la ganancia de masa ocurre en el contexto de un proceso de regeneración hepática inducido por ambos procedimientos quirúrgicos (Figura 13). A su vez,

la ausencia de cambios en los niveles séricos del resto de los marcadores de progresión de regeneración estudiados, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , podría deberse a un insuficiente número de ratas incluidas en tales mediciones.

Así, todos los hallazgos previamente señalados, tanto en humanos como en ratas a nivel experimental, indican que la cirugía de ALPPS efectivamente induce regeneración y neoformación de tejido hepático funcional.

En el remanente se midió la expresión de genes asociados a la vía de señalización de mTOR, ya que controla procesos anabólicos celulares importantes, integrando señales secundarias a factores de crecimiento, disponibilidad de nutrientes y estado energético celular [110, 112] (Figura 2), fenómenos que podrían participar en la respuesta gatillada por ALPPS. En pacientes se observó un aumento significativo en los mensajeros de mTOR y de sus efectores S6K1 y 4E-BP1 en muestras tomadas en el segundo tiempo operatorio, lo que sumado a la ausencia de cambios en AMPK, que regula negativamente la activación de mTOR, sugieren que esta vía molecular se encuentra activada (Figura 28).

Adicionalmente, la mayor expresión de los mensajeros del heterodímero TSC1/TSC2, sumado a la ausencia de cambios en AMPK en el tejido remanente, sugiere que la acción de este heterodímero podría estar siendo modulada predominantemente por señales mediadas por factores de crecimiento, lo que tendría como consecuencia una activación neta de la acción de mTOR [110] (Figura 2). Sin embargo, no se objetivaron cambios significativos en muestras humanas obtenidas al segundo tiempo operatorio, en la expresión del gen Akt, cuya vía de señalización depende del estímulo por factores de crecimiento procedentes del flujo portal [72] (Figura 28).

La ausencia de cambios en la expresión de genes moduladores río arriba de la vía de señalización mTOR observada en muestras humanas, se podría explicar debido al marco temporal en el cual se tomaron las muestras de tejido, por lo que es posible que el perfil de cambio en la expresión de tales genes se encuentre enmascarado por la ausencia de mediciones seriadas, debido a la imposibilidad de su libre acceso en el escenario clínico. De esta manera, la estandarización del modelo experimental *in vivo* de ALPPS y sus respectivos controles, permiten la obtención repetida y en tiempos sucesivos de muestras biológicas, lo que a su vez posibilita una disección –y estudio más preciso- de los eventos moleculares durante este fenómeno.

Así, tanto en ratas ALPPS como en grupo ligadura portal, se observó un incremento precoz de la expresión de mTOR y su efector río abajo S6K1, lo que sumado, al hecho que el heterodímero TSC1/TSC2 es inducido significativamente durante las primeras 72 hrs en ambos grupos –y en una magnitud comparable-; implica que la vía de señalización mTOR en ratas sometidas a ALPPS, se encuentra activada, de forma similar al hallazgo obtenido en muestras humanas, siendo esto un evento temprano tras la realización de ambos procedimientos quirúrgicos (Figura 18).

Sin embargo, en el análisis temporal del perfil de expresión de los genes antes señalados, se establecen ciertas diferencias entre el grupo de ratas ALPPS y ligadura portal, por cuanto en el grupo ligadura portal existe una reducción en la expresión de todos los genes previamente señalados tras un punto máximo observado a las 24 hrs hasta su completa regresión a los 7 días, mientras que ratas ALPPS presentan un aumento de expresión en forma sostenida del heterodímero TSC1/TSC2 durante las primeras 72 hrs, luego del cual sus niveles se estabilizan a un rango similar a los controles a los 7 días.

A su vez, en ratas ALPPS el gen mTOR presenta una expresión máxima a las 24 hrs, seguido de una disminución transitoria a las 72 hrs, para posteriormente continuar con una expresión elevada del mensajero comparado con todos los controles a los 7 días, por lo que mTOR estaría inducido de forma persistente y significativa, incluso después que el proceso regenerativo se estabiliza (Figura 18).

En este contexto, el comportamiento de mTOR podría tener relación con la expresión de los genes río arriba moduladores de esta vía. Así, resulta interesante destacar que la expresión del gen Akt en ratas ALPPS, a diferencia de lo observado en humanos, aumenta significativamente a las 24 hrs, aunque en una magnitud menor que en el grupo ligadura portal. Sin embargo, a diferencia de éste último grupo experimental, en el grupo ALPPS persiste el aumento del mensajero de Akt a las 72 hrs, con una regresión menos acentuada a los 7 días, en comparación con todos los grupos controles (Figura 18).

El aumento del mensajero de Akt en ligadura portal y ALPPS, se interpreta en el contexto de la redistribución del flujo portal –y por tanto, de sus componentes tales como factores de crecimiento, entre otros- que ingresan al tejido hepático no deportalizado –remanente- en ambos casos. No obstante, la optimización de la redistribución del flujo determinada por la adición de la transección en el grupo ALPPS, establece una persistencia en la expresión de Akt más allá de las 72 hrs. Esto, tendría como resultado una activación de la vía de mTOR en forma precoz y persistente durante por lo menos las primeras 72 hrs comparado a los controles –ligadura portal, transección y *sham*-; lo que resultaría en una mayor proliferación celular –objetivada en estos tiempos-, y por consiguiente, en una ganancia de masa hepática más rápida (Figura 8).

Por otro lado, la disminución transitoria de la expresión de mTOR observada en ratas ALPPS al tercer día post operatorio, ocurre en concomitancia con una significativa inducción del gen de AMPK, cuya activación se asocia a estados de desbalance energético intracelular [119], por lo que se le ha atribuido un rol como sensor energético que inhibe procesos anabólicos, a la vez que estimula la  $\beta$ -oxidación y cetogénesis [119, 121]. De esta manera, el significativo incremento de expresión de la subunidad  $\alpha$  catalítica de AMPK a las 72 hrs en ratas ALPPS, que supera considerablemente a los grupos controles, se podría atribuir a la gran explosión o “*burst*” proliferativo hepatocelular objetivado en este tiempo post operatorio, que implica una reducción de las reservas energéticas intracelulares, resultando en una disminución transitoria de la expresión de mTOR.

Estudios previos en modelo de regeneración asociado a ligadura portal en ratas, han establecido que la respuesta hiperplásica hepática se inicia a partir de hepatocitos periportales, es decir, aquellos que se encuentran más cercanos al flujo de entrada arterio-portal, correspondientes a la zona 1 de los acinos hepáticos [80]. Tal situación se observó en nuestras ratas sometidas a ligadura portal, a diferencia de las ratas ALPPS, las que no muestran ese patrón de distribución proliferativa por cuanto el reclutamiento de hepatocitos comprende a todo el acino hepático –zonas 1, 2 y 3-, y en magnitud cuantitativamente mayor a los controles. Así, el nivel máximo de respuesta proliferativa alcanzado al tercer día post operatorio en ratas ALPPS, se condice con niveles máximos de expresión de AMPK y mínimos de expresión de mTOR, debido, como es esperable, al significativo estrés metabólico al que se encuentran sometidos los hepatocitos en esta etapa del proceso.

Existe evidencia que sugiere que AMPK podría mediar respuestas prorregenerativas secundarias al estímulo de HGF mediado por la activación de LKB1, siendo ésta, una

respuesta específica de hepatocitos [138]. Así, se ha visto que la fosforilación de AMPK en cultivos de hepatocitos, induce la localización citosólica de la proteína de unión a RNA denominada HuR (*Human antigen R*), aumentando la vida media de distintos mRNA, dentro de los que destacan mRNA de los genes ciclina D1 y A2 [138, 139]. En este sentido, cabe destacar que la respuesta proliferativa observada a las 24 hrs en ratas ALPPS –que supera significativamente a los grupos controles-, se asocia a una expresión moderada del mensajero de AMPK, de forma similar a lo observado en grupo ligadura portal, lo que sumado al significativo aumento en la expresión de HGF y mTOR en el remanente en este tiempo post operatorio, y a la presencia de proliferación hepatocelular, teniendo en cuenta su incremento posterior observado a las 72 hrs; sugieren que en tiempos precoces, la inducción de AMPK si no facilita, al menos, no bloquea el fenómeno de regeneración hepática.

En conjunto estos resultados sugieren que AMPK tiene un rol dual en el fenómeno regenerativo observado en ALPPS, donde la inducción moderada de la expresión de AMPK observado precozmente, sería un estímulo facilitador, y eventualmente promotor, de la respuesta regenerativa hepatocelular. Mientras que en un tiempo posterior, en el que se ha alcanzado el 87% de la masa hepática del remanente final, y el 96% de la relación masa hepática remanente/masa corporal final, AMPK contribuiría al inicio del término de la respuesta proliferativa a través del bloqueo de la expresión de mTOR.

Adicionalmente, un signo de estrés metabólico secundario al importante gasto energético de hepatocitos en activa proliferación, corresponde a la tendencia a la disminución del contenido hepático de glucógeno, evaluado en muestras histológicas de ratas ALPPS teñidas con ácido peryódico Schiff. Así, los resultados obtenidos en este estudio, indican desde el punto de vista cualitativo, que tanto en ratas *sham* como sometidas a transección, existe



mayor cantidad de glucógeno en hepatocitos periportales que pericentrales a las 24 hrs. Sin embargo, tal distribución cambia en el grupo ligadura portal, donde la respuesta proliferativa hepatocelular, que se inicia en hepatocitos periportales, determina que la cantidad de glucógeno sea menor en la zona 1 versus el contenido observado en hepatocitos centrolobulillares –más lejanos al flujo de entrada hepático-, siendo máxima tales diferencias a los 7 días. Este mismo patrón de distribución de la tinción se observó en ratas sometidas a ALPPS, aunque con diferencias de tinción más tenue entre las distintas zonas, posiblemente por el gran reclutamiento de células en proliferación lo que determina una disminución global del contenido de glucógeno hepático, y una tinción más uniforme (Figura 16).

El fenómeno de esteatosis hepatocelular transitoria, descrito en el proceso de regeneración hepática posterior a distintos estímulos [100], también se encuentra presente en animales sometidos a ALPPS. Si bien el rol fisiológico de esta respuesta no ha sido plenamente dilucidado, en modelos experimentales se ha determinado que la administración dietaria y parenteral de formulaciones compuestas de distintos tipos de lípidos aceleran la respuesta proliferativa hepatocelular inducida por toxinas o resección hepática [140, 141]. Así, la acumulación de lípidos hepáticos durante este proceso se ha interpretado en el contexto de una respuesta lipogénica adaptativa, cuyo origen, atribuido a la movilización periférica de ácidos grasos procedente de adipocitos sistémicos, representaría una fuente de obtención energética para los procesos anabólicos en curso [96].

En ratas sometidas a ALPPS se evidencia esteatosis hepática significativa a las 24 hrs – superior a todos los controles- (Figura 17), con un patrón de distribución homogéneo al análisis histológico. Sin embargo, no es clara su asociación a la movilización de ácidos grasos a nivel periférico, debido a que su cuantificación plasmática no presentó variaciones

significativas entre los distintos grupos experimentales, por lo que posiblemente la optimización de la redistribución del flujo portal y sus componentes, como micronutrientes y ácidos grasos procedentes del flujo esplácnico, hacia el tejido hepático remanente; presente un rol preponderante en el origen de esta respuesta biológica. Finalmente, la significativa disminución de la esteatosis en tiempos posteriores existente en ratas sometidas a modelo de ALPPS, alcanzando niveles mínimos al séptimo día post operatorio comparado a todos los controles, representa un signo indirecto de la expresión de AMPK, que como se señaló con antelación, estimula la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y cetogénesis [119, 121], así como también, podría ser a consecuencia de la importante respuesta proliferativa hepatocelular evidenciada, que se corresponde a un mayor gasto energético asociado a la biosíntesis de macromoléculas y biogénesis de organelos esperado en este contexto.

En virtud de los hallazgos encontrados en este modelo experimental, es razonable asumir que las modificaciones moleculares precederían a los fenómenos observados a nivel tisular y celular. Es así como la magnitud de la respuesta proliferativa, que alcanza niveles máximos al tercer día post operatorio, se reconoce como un fenómeno posterior a las modificaciones moleculares que tanto para el grupo ligadura portal como ALPPS, son mayormente pesquisadas a las 24 hrs de realizados los procedimientos quirúrgicos.

A esto se agrega, que los cambios a nivel de expresión de todos los genes que forman parte de la cascada de señalización de mTOR, y que sugieren la inducción de esta vía molecular, debe ser corroborada por cambios concordantes con la cantidad de proteína tanto en su estado nativo como fosforilado. Así, se decidió la medición de niveles proteicos de mTOR a las 24 hrs, debido a que en esta molécula confluye la acción de los productos génicos de toda la vía de señalización río arriba.

De esta manera, en ratas sometidas a modelo de ALPPS, se constató un significativo incremento en la cantidad de proteína de mTOR, tanto en su estado nativo como en su estado fosforilado –activado- respecto a la situación basal representada por las ratas *sham* (Figura 19), resultado que es concordante con los cambios advertidos a nivel de expresión de mTOR, por lo que el aumento significativo de la relación proteica de mTOR fosforilado/no fosforilado en ratas ALPPS, sugiere que no sólo la vía se encuentra inducida en cuanto a expresión génica, sino que además, activada a nivel proteico en este grupo experimental.

Con el fin de establecer el rol en la respuesta prorregerativa hepática de mTOR, se estudió el impacto sobre este fenómeno en ratas sometidas a ALPPS bajo el efecto de la inhibición selectiva de mTOR con el fármaco rapamicina, objetivándose en este grupo una significativa disminución de la ganancia de masa hepática –cuantificado a través de la relación peso de remanente/peso corporal total- tanto a las 72 hrs como al séptimo día post operatorio comparado a los grupos ligadura portal y ALPPS (Figura 20).

Es importante destacar, que si bien se compromete profundamente la ganancia de masa hepática –y por tanto el proceso de regeneración- en ratas ALPPS bajo los efectos de rapamicina, se advierte cierto aumento de masa hepática remanente con diferencias estadísticas respecto a grupos *sham* y transección en los tiempos antes señalados. Si bien una posible explicación a tales hallazgos sea que la dosis del fármaco utilizado haya sido insuficiente, esta hipótesis se descarta rápidamente toda vez que rapamicina determina un bloqueo de la expresión génica de mTOR respecto a los niveles basales –representado por las ratas *sham*-, así como también, una reducción significativa en la cantidad absoluta de proteína mTOR nativa y fosforilada (Figura 19). Una manera de establecer evidencia adicional respecto

a este punto, sería mediante la utilización de animales *knock-out* de mTOR específico en tejido hepático.

En este contexto, la explicación más razonable a la existencia de incremento de masa hepática en ratas ALPPS tratadas con rapamicina, se debe a que el proceso de regeneración hepática es un fenómeno biológico altamente complejo, con participación de varios tipos celulares, siendo molecularmente redundante y con múltiples vías de señalización que determinan una respuesta adaptativa del tejido hepatocelular. Este potencial de adaptación del tejido hepatocelular, que se manifiesta mediante la preservación de la capacidad de regeneración, es una propiedad evolutivamente conservada, debido a la importancia crítica para la supervivencia de las funciones hepáticas, lo que requiere una plasticidad biológica que difícilmente puede –ni debe- ser entendida dentro de la rigidez que supone el estudio de una sola vía molecular.

Finalmente, tomando en cuenta el conjunto de resultados y hallazgos previamente analizados, es factible considerar la propuesta de un modelo de regeneración hepática en ALPPS (Figura 29). Así, los principios quirúrgicos que fundamentan esta técnica, los cuales implican la combinación de ligadura portal junto a la transección del parénquima hepático, gatillan una serie de eventos biológicos que sumados convergen en una respuesta prorregenerativa significativa.

De esta manera, la ligadura de una –o varias- ramas portales, determina precozmente una redistribución del flujo portal hacia el tejido hepático remanente, cuyos componentes como factores de crecimiento y micronutrientes procedentes del flujo esplácnico, contribuiría a la inducción de vías anabólicas –dependientes de Akt-, y a la acumulación precoz de lípidos

–esteatosis transitoria-, ambos fenómenos asociados a inducción y progresión de regeneración hepática [72, 96].

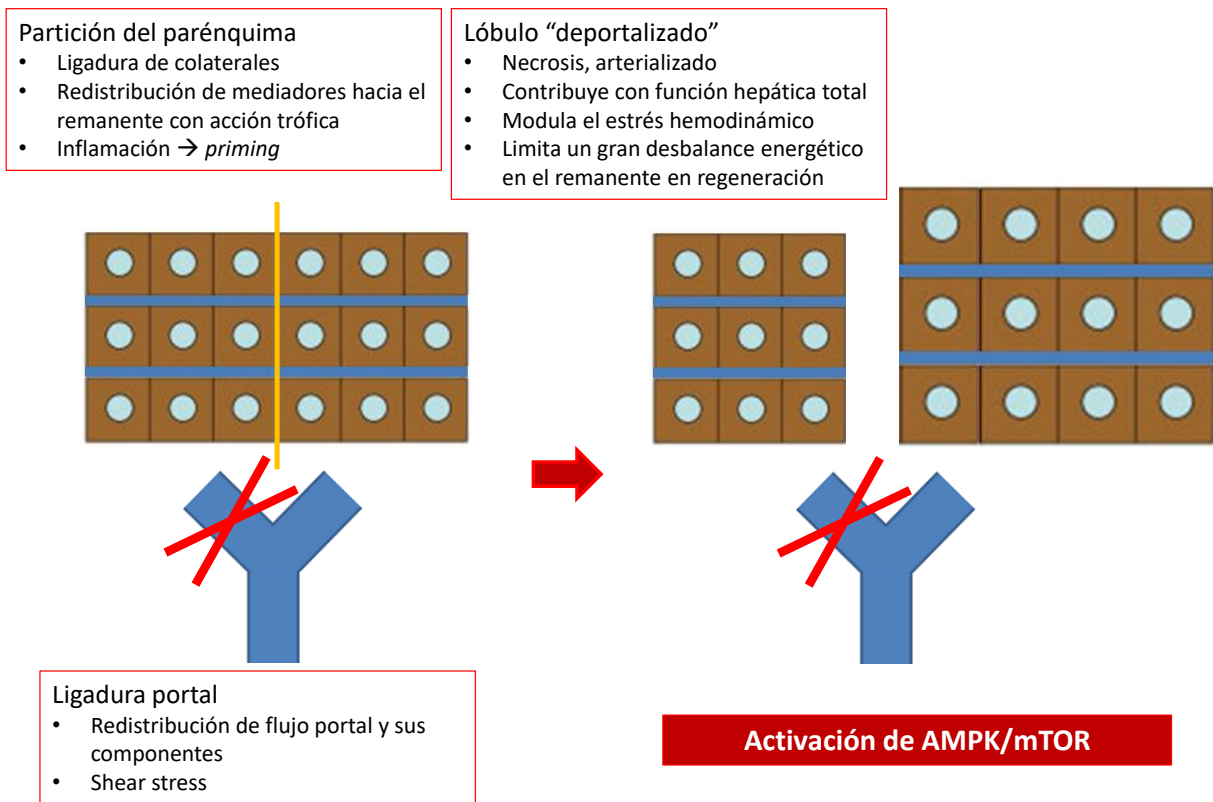
La transección del parénquima, que implica la sección y ligadura de colaterales intrahepáticas, optimiza la redistribución del flujo y sus mediadores con acción trófica sobre el tejido hepático remanente, a la vez que el daño hepatocelular durante la partición, produce una respuesta inflamatoria precoz y local, que facilitaría el *priming* de hepatocitos.

El tejido hepático deportalizado que conserva su flujo arterial preserva una fracción de parénquima hepático vital y funcional. Sin embargo, el flujo arterial no es capaz de compensar adecuadamente y por completo la deprivación del flujo portal, en parte debido a la sección de colaterales determinado por la transección, lo que se manifiesta con la aparición de focos de necrosis que en el corto plazo gatilla una respuesta inflamatoria sistémica, prolongando la fase de *priming* de los hepatocitos, y permitiendo un mayor reclutamiento de células capaces de responder a señales mitógenas en el remanente.

Por otro lado, la preservación de tejido hepático deportalizado, y arterializado, contribuye inicialmente con la función hepática global, dando como resultado un estado de estrés metabólico moderado y temprano en el remanente, que se manifiesta con una inducción moderada de la proteína AMPK, cuya activación en un tiempo precoz y bajo los efectos del importante aumento en la expresión de HGF, favorecería y promovería una respuesta proliferativa hepatocelular.

Es importante destacar en este punto, que la redistribución del flujo portal induce *shear stress* a nivel endotelial, el cual ha sido asociado a la inducción de respuestas prorregenerativas a nivel hepático. Sin embargo, la redistribución de flujo portal y arterial en un remanente proporcionalmente insuficiente, ha sido asociado a signos de daño sinusoidal y

hepatocelular en modelos de hepatectomía, lo que redundaría en un deterioro de tal respuesta prorrregenerativa. Desde luego, que tales mecanismos –no considerados en los alcances de esta tesis- debieran estar operando en ALPPS, siendo relevante señalar –desde un punto de vista estrictamente teórico-, que la preservación de flujo arterial en el tejido hepático deportalizado, contribuiría con la modulación del estrés hemodinámico en el remanente, impidiendo y/o limitando el posible daño por hiperflujo, lo que facilitaría los fenómenos de regeneración.



**Figura 29.** Modelo propuesto de regeneración hepática en ALPPS.

Todos estos eventos biológicos, que derivan en una respuesta proliferativa explosiva –y que podríamos denominar como *burst* proliferativo post ALPPS-, se asocian a una activación precoz y persistente de la vía de señalización de mTOR, lo que resulta en una ganancia de masa hepática acelerada, alcanzando el nivel de equilibrio en un periodo significativamente menor. Así, en el momento en que se consigue un nivel de proliferación celular de tal

magnitud, que comienza a limitar las reservas energéticas intracelulares, la significativa inducción de AMPK determinaría el gatillamiento de señales que conducirían a la modulación y terminación del proceso de regeneración.

### **VIII. Reflexiones finales y perspectivas futuras**

Pese a la superioridad que muestra la técnica de ALPPS frente a otras estrategias terapéuticas para la obtención de incremento volumétrico de remanentes hepáticos considerados insuficientes, aún existe resistencia a su aplicación por parte de algunos equipos quirúrgicos especializados.

El escepticismo aún presente para el ALPPS, se fundamenta en que el corto periodo entre el 1° y 2° tiempo quirúrgico, impediría aprovechar al tiempo como herramienta de selección para la resección quirúrgica, según el comportamiento tumoral y su riesgo de diseminación a distancia [142]. A su vez, la manipulación de un hígado con alta carga tumoral sometido a una gran cascada inflamatoria y a factores de crecimiento liberados durante el trauma quirúrgico inicial –“*all touch technique*”- con libre flujo sanguíneo hepático de salida, determinaría una recurrencia tumoral más precoz [143], surgiendo dudas respecto al resultado clínico a largo plazo [142, 143]. No obstante, tal como se discutió previamente, no se han establecido diferencias en curvas de supervivencia libres de progresión de pacientes sometidos a ALPPS versus series históricas de embolización/ligadura portal al corto plazo [55], y la supervivencia de 45,5% observada en nuestra casuística a casi 5 años de seguimiento, representan argumentos contundentes en contra de tales inferencias

Algunos estudios sugieren que la hipertrofia de un remanente hepático insuficiente conseguida con la embolización de la rama portal derecha, podría ser optimizada al sumar la embolización dirigida de las ramas portales del segmento IV, logrando niveles de hipertrofia entre 54-69% cercanos al obtenido en ALPPS [68, 142, 144, 145]. Sin embargo, la embolización del segmento IV es un procedimiento complejo, con tasas de éxito variable y poco reportada en torno al 90% [41, 68], al que se agrega el riesgo de embolización de ramas



portales del hígado remanente y/o trombosis de vena porta [145]. A su vez, este procedimiento presenta el mismo retardo en alcanzar la hipertrofia suficiente del remanente que la oclusión portal derecha única, con tasas de no resecabilidad similares a las hepatectomías con embolización/ligadura portal preoperatoria (30%), ya sea por progresión tumoral y/o a hipertrofia insuficiente [68, 144, 145]. Es así como se ha demostrado en estudios angiográficos de cerdos sometidos a embolización o ligadura portal la formación de neocolaterales, particularmente en animales que presentan hipertrofia insuficiente [146]. En este sentido, la transección del parénquima en ALPPS, evitaría la neovascularización y el flujo portal interlobar, lo que ayudaría a optimizar la regeneración, toda vez que se ha reportado su utilidad en casos de embolización portal con niveles insuficientes de hipertrofia a fin de permitir la hepatectomía, lo que se ha denominado “ALPPS de rescate” [52, 147].

Es importante mencionar, que la embolización portal impide la evaluación de la cavidad abdominal, a diferencia del ALPPS, cuya técnica permite una completa exploración del abdomen y del hígado tanto visual como táctil, además de una evaluación ecográfica intraoperatoria –que es capaz de pesquisar 10-26% de lesiones adicionales no observadas en estudios preoperatorios pudiendo cambiar el plan quirúrgico hasta en el 76% de los casos- [148, 149]. De esta manera, ALPPS permite optimizar la selección de los pacientes según el grado de compromiso tumoral local –hepático- y a distancia –lesiones extrahepáticas y/o carcinomatosis peritoneal-, factor que podría explicar en parte la alta tasa de no resecabilidad en casos de embolización portal por progresión tumoral, ante la imposibilidad de tal evaluación crítica durante este procedimiento. Sin embargo, evidencia publicada recientemente que estudió una cohorte prospectiva de n=20 pacientes sometidos a embolización portal preoperatoria para el manejo resectivo de lesiones tumorales hepáticas

metastásicas de cáncer colorrectal, encontró que en el 65% (n=13/20) de los pacientes embolizados sus metástasis progresaron, mostrando un aumento de volumen tumoral de un 58% (rango entre 18-234%) en los controles imagenológicos, mientras que el análisis molecular de biopsias seriadas de las lesiones tumorales en tales pacientes obtenidas pre y post procedimiento, presentó una significativa sobreexpresión de genes relacionados a vías de transducción de citoquinas y factores de crecimiento (IL-17, IL-6, PI3K e IGF-1), así como a la desregulación de genes claves implicados en el fenómeno de oncogénesis tumoral (FOS, FOSB, RAB20, IRS2) [150], lo que representa una base científica sólida de una situación observada con regularidad en la práctica clínica.

Desde un punto de vista conceptual, tanto la técnica de ALPPS como la embolización portal, son terapias transitorias que constituyen un puente para que la resección quirúrgica del tejido hepático comprometido, sea efectuada con un mayor perfil de seguridad clínica. En este contexto, es esperable que tales tipos de terapias cumplan con ciertas premisas para su correcta aplicación. En primer término, es preciso que sean eficientes en el objetivo primario a lograr, es decir, que permitan una adecuada ganancia de tejido hepático remanente futuro tras su realización. Los resultados obtenidos en esta tesis, así como la evidencia disponible discutida en este trabajo, apoyan con alto grado de certeza un mayor éxito de la técnica de ALPPS para este fin, comparado con reportes históricos de series de pacientes sometidos a embolización/ligadura portal [151].

A su vez, para que una terapia “puente” tenga sentido, se requiere que su aplicación se desarrolle en el menor marco temporal posible, entendiendo que ésta será ofrecida a pacientes con una enfermedad oncológica de base, en la mayoría de los casos, en etapas avanzadas. Así, el incremento volumétrico del remanente hepático obtenido con la técnica de ALPPS acontece

en un plazo significativamente menor al observado con embolización/ligadura portal, situación corroborada en la serie de pacientes estudiados en este trabajo y avalada en la literatura internacional [151], dejando cada vez menor margen de discusión a un tópico que con reticencias iniciales ha ido logrando progresiva aceptación. El impacto del factor tiempo en el tratamiento de pacientes oncológicos no puede sino, en el caso del ALPPS, interpretarse de una manera ventajosa respecto a otras técnicas diseñadas con el mismo fin – embolización/ligadura portal preoperatoria-, puesto que impide la desaconsejable dilatación de la terapia quirúrgica resectiva definitiva.

El tercer aspecto a considerar en este tipo de terapias, hace referencia a su seguridad clínica. Si bien la morbilidad inicialmente reportada hacía prohibitiva la técnica de ALPPS, considerando la escasa morbilidad y casi nula mortalidad de la embolización portal preoperatoria, los resultados clínicos de las primeras series publicadas de ALPPS, que consideran experiencias iniciales de distintos centros de cirugía hepatobiliar de alto y bajo volumen quirúrgico, se ven contaminados por la alta heterogeneidad y gravedad clínica de los pacientes intervenidos –con enfermedades oncológicas en etapas más avanzadas y previamente excluidos de otras modalidades terapéuticas y/o quirúrgicas con fines curativos- siendo sometidos a una cirugía de complejidad mayor en etapa de evaluación, con escasa experiencia técnica, una curva de aprendizaje incipiente y en ausencia de selección clínica en virtud de factores de riesgos identificables.

Sin embargo, aunque la técnica de ALPPS implica dos cirugías cuya morbimortalidad es sumatoria, al analizar el momento en que ocurren las complicaciones de los pacientes de esta serie sometidos a ALPPS, queda en evidencia que la inmensa mayoría de ellas –el 80% de éstas- se presentan tras el segundo tiempo operatorio resectivo. Es decir, tras la realización de

la ligadura portal y transección hepática –etapa I de ALPPS-, la evolución clínica es altamente favorable, con mínimas incidencias y sin mortalidad. Por lo tanto, cuando se analiza la morbilidad atribuida a estas técnicas –terapias puente o transitorias- se debe contrastar la incidencia de complicaciones de la etapa I del ALPPS, con la observada en series de embolización/ligadura portal aislada, siendo en ambos casos altamente comparables. A su vez, la morbimortalidad global de la técnica de ALPPS debe ser analizada contra las técnicas de hepatectomía en dos tiempos con o sin embolización/ligadura portal preoperatoria, en que tal como ha sido señalado anteriormente, las cifras tienden a igualarse. Tras la descripción inicial de ALPPS, los sucesivos reportes clínicos han ido progresivamente mostrando mejores resultados de morbilidad y mortalidad, siendo en algunos casos similares a los obtenidos en hepatectomías convencionales mayores [152].

En este sentido, publicaciones posteriores del registro internacional de ALPPS, que incluye el análisis de 320 pacientes sometidos a este procedimiento, ha confirmado las variables previamente señaladas como predictoras de complicaciones y mortalidad, a las que se agrega el MELD (*Model of end-stage liver disease*) >10 previo a la segunda etapa del ALPPS y los criterios 50-50 de insuficiencia hepática post operatoria tras la etapa I de ALPPS, como factores con significativo valor predictivo de evolución post operatoria y mortalidad a 90 días [153]. Tales hallazgos, establecieron las bases para el desarrollo de un *score* de riesgo de ALPPS que permite predecir el riesgo individual de un paciente sometido a esta técnica, con el objetivo de retardar el segundo tiempo resectivo y/o eventualmente evitarlo en casos de muy alto riesgo quirúrgico, en que se estime fútil la concreción de la hepatectomía [154].

Es así como, los trabajos antes referidos, han representado un esfuerzo exitoso por reducir la morbimortalidad post operatoria de ALPPS, a través de la racionalización de la

indicación quirúrgica, donde el tipo de tumor hepático a tratar –ya sea primario de origen biliar o secundario metastásico colorrectal o no colorrectal- presenta un significativo impacto en los resultados clínicos. De esta manera, ha sido posible establecer en un 8,8% la mortalidad global de la técnica, mientras que en pacientes sometidos a ALPPS con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal esta cifra se ha fijado en 4% [153], lo que deja en evidencia que los tumores primarios de origen biliar tipo colangiocarcinoma perihiliar, intrahepático y/o cáncer de vesícula concentran la mayor morbimortalidad, situación observada transversalmente en la mayoría de las series publicadas.

Múltiples variables determinan el éxito de un procedimiento quirúrgico. En primera instancia, los resultados son dependientes de variables técnicas efectuadas por el cirujano durante el acto operatorio, esto es del grado de prolijidad técnica asociada a la intervención. Otro grupo de determinantes se encuentra asociado al manejo médico perioperatorio, y que implican tanto los cuidados médicos pre y post quirúrgicos, así como un apropiado manejo anestésico. A pesar de la obviedad de las variables antes descritas, las que se encuentran bajo influencia directa del clínico, los factores asociados al paciente presentan una trascendencia en ocasiones poco considerada de manera consciente en la práctica clínica-quirúrgica rutinaria.

Si se considera que un procedimiento quirúrgico corresponde conceptualmente a un trauma tisular efectuado de manera controlada, cuyo resultado primariamente depende de los procesos biológicos de inflamación y cicatrización asociado a la respuesta de reparación de tejidos, no es difícil entender que factores como la edad, las comorbilidades, los hábitos, el uso de fármacos, entre otras características clínicas dependientes del paciente, pueden influir significativamente en los resultados de un procedimiento quirúrgico, al condicionar la capacidad de respuesta biológica adaptativa que tiene el órgano o sistema intervenido en

cuanto a sus características estructurales, así como también funcionales. En otras palabras, el éxito del procedimiento se encuentra afectado directamente por la capacidad de respuesta fisiológica a la agresión quirúrgica, lo que guarda estrecha relación con la reserva fisiológica que permita preservar su integridad estructural y conservar su continuidad funcional.

El hígado corresponde a un órgano con características altamente plásticas cuya respuesta adaptativa al trauma quirúrgico, especialmente ante la resección de parénquima, es dependiente de sus propiedades de regeneración. La técnica de ALPPS intenta optimizar y/o maximizar el potencial de adaptación del tejido hepático, a través de la inducción del fenómeno de regeneración hepatocelular. Esta respuesta biológica adaptativa gatillada por ALPPS, ocurre a pesar de conocidos factores adversos de regeneración, tales como edad, sangrado intraoperatorio, antecedente de quimioterapia preoperatoria, entre otros [66], lo que implica que el cirujano mediante esta técnica, está modulando directamente mecanismos cuya expresión se traducen a nivel celular y molecular. Por consiguiente, se requiere de una aproximación a los mecanismos moleculares de los procesos patológicos y terapéuticos inducidos por la práctica quirúrgica, lo que abre diversas perspectivas de desarrollo e investigación biomédica en esta área, cuyos resultados pueden tener implicancias prácticas directas.

En este contexto, desde el punto de vista oncológico, es posible plantear líneas de investigación con respecto a los mecanismos de oncogénesis de diversos tumores primarios hepáticos de origen biliar y/o hepatocelular, entendiendo que algunos de estos fenómenos podrían tener como punto de partida la desregulación de procesos moleculares normalmente presentes en la respuesta regenerativa hepática normal [72, 110, 112]. Así, se han descrito en tumores primarios hepáticos una variedad de mutaciones con ganancia de función de genes

pertenecientes a la vía de mTOR [155], mientras que se ha ensayado el uso de inhibidores de mTOR como agentes quimioterapéuticos con acción antitumoral [156, 157].

La disfunción y/o insuficiencia hepática post operatoria observada en ciertos escenarios clínicos específicos, particularmente post trasplante hepático –condición conocida como *small for size syndrome*- se ha atribuido a la injuria secundaria a hiperflujo arterioportal de un injerto cuantitativa y/o proporcionalmente insuficiente para el receptor [94, 95]. La consecuencia fisiopatológica de este proceso se manifestaría a través de una respuesta regenerativa hepática defectuosa [93, 158], lo que restringiría la capacidad de adaptación biológica del injerto necesaria para un adecuado funcionamiento post implante. En ALPPS el daño por hiperperfusión teóricamente se encuentra limitado, al mantenerse el tejido hepático total *in situ* durante el fenómeno regenerativo, sin embargo, no existe evidencia que evalúe cuantitativamente los flujos portales y arteriales en pacientes sometidos a ALPPS –ni en modelos experimentales-, como así tampoco los umbrales de flujo por unidad de tejido sobre el cual se podría establecer cierto grado de daño tisular. Adicionalmente, los principios fisiológicos presentes en los mecanismos de autorregulación del flujo arterioportal y su impacto en las diferencias de presión parcial de oxígeno tisular –situación pendiente de evaluar en ALPPS-, permiten plantear el diseño de estrategias terapéuticas conducentes a modular el estado de hiperperfusión con el objetivo de tratar esta condición clínica o prevenirla mediante la aplicación de ciertas maniobras técnicas intraoperatorias –tales como esplenectomías, ligadura de arteria esplénica y/o derivaciones portosistémicas- cuando se estime un potencial riesgo de desarrollo de insuficiencia hepática post operatoria ante resecciones hepáticas extendidas o en injertos trasplantados pequeños [159].

No obstante, el principal problema presente en la actualidad en cirugía de trasplantes – particularmente en trasplante hepático-, corresponde a la escasez de órganos disponibles para su implante en pacientes severamente enfermos que lo requieren. Esta situación deriva en la necesidad de ampliar el número de órganos disponibles, motivo por el cual se han propuesto diversas alternativas de manejo que incluyen el uso de órganos marginales, asociados o no a técnicas de perfusión como método de valoración predictiva de funcionalidad del injerto post trasplante, el tratamiento de hígados marginales procurados previo a su implante, hígados de donantes con muerte cardiaca, la técnica de *split liver in situ* o *ex situ*, e hígados de donantes vivos con receptores pediátricos o adultos [160]. Todas estas estrategias quirúrgicas diseñadas para optimizar el uso de órganos procurados, a fin de aumentar el número de trasplantes, presentan la necesidad de una adaptación biológica del injerto que depende en parte de los procesos de regeneración hepática, fenómeno que podría ser facilitado a través del diseño y aplicación de terapias quirúrgicas invasivas, como las antes referidas, y/o tratamientos farmacológicos no invasivos cuyas dianas terapéuticas surgen a partir de modelos experimentales de investigación de los mecanismos moleculares implicados en este contexto.

Por otro lado, el conocimiento obtenido a partir del análisis de los procesos biológicos relacionados con la respuesta regenerativa hepatocelular, junto a la trascendencia clínica de éstos, constituyen la piedra angular para que en un futuro se posibilite el diseño *in vitro*, a través de procesos de bioingeniería, de modelos biológicos biocompatibles que permitan ejercer funciones como sustitutos hepáticos parciales o totales, ya sea en forma temporal o definitiva, según las necesidades presentes en diversos escenarios clínicos.

Los hallazgos obtenidos en el transcurso de este trabajo de investigación, tanto a nivel clínico como en el modelo experimental propuesto, permiten confirmar la significativa



plasticidad que el tejido hepático presenta en términos de incremento de masa parenquimatosa, propiedad que parece ser intrínseca del hígado y que constituye la base de su adaptación morfofuncional. Así, la gran plasticidad demostrada a nivel hepatocelular se corresponde con observaciones recientes de pacientes sometidos a modificaciones técnicas de ALPPS, en el que cumpliendo los mismos principios originalmente propuestos, el remanente queda restringido a un segmento hepático único. Es así como esta técnica llevada a tal extremo ha sido efectuada de manera exitosa, reportándose bajo la denominación de “ALPPS monosegmento” [161-164]. A su vez, la publicación de variaciones técnicas adicionales con diversos objetivos, orientados inicialmente a la limitación de la morbilidad y/o invasividad del procedimiento, como la técnica de ALPPS realizada por vía laparoscópica o robótica; cuya transección sea efectuada de manera parcial, mediante la aplicación de un torniquete o con ablación por radiofrecuencia o microondas, en vez de sección y ligadura de colaterales del tejido hepático [165-171]; o la realización de esta técnica mediante procedimientos mínimamente invasivos, como la oclusión portal a través de embolización percutánea asociada a transección hepática mediante la aplicación de microondas –lo que se ha publicado como “mini ALPPS”- [172]; conservando por tanto las bases conceptuales de la técnica original, constituyen evidencia adicional que apoya las propiedades de adaptabilidad y plasticidad del hígado antes referidas.

Es importante destacar, que los crecientes conocimientos adquiridos de los trabajos clínicos y experimentales a partir de la descripción inicial de esta técnica quirúrgica, ha tensionado directamente ciertos principios clásicos de la cirugía hepática, particularmente el que establece la necesidad de conservación de un remanente hepático constituido por dos segmentos adyacentes [23]. Este principio fundamental queda relativizado tras la realización

de la técnica de ALPPS monosegmento, lo que a su vez, añade diversos cuestionamientos respecto a los límites de la cirugía hepática en términos anatómicos, así como a la dinámica de recuperación de la completa competencia funcional.

En este sentido, persiste por dilucidar si la significativa plasticidad que muestra el incremento de la masa hepatocelular en ALPPS, presenta correspondencia con el grado de recuperación y/o preservación de la competencia funcional del remanente regenerado, es decir, si esta plasticidad también se manifiesta en términos funcionales, lo que debiera ser analizado a través del estudio de diversos parámetros dinámicos de función hepatocelular, tanto a nivel clínico como en el laboratorio. Si bien la incidencia de insuficiencia hepática post operatoria es baja en ALPPS, su aparición en pacientes que presentan remanentes suficientes en términos volumétricos, sugiere que pese a la significativa ganancia de masa hepática, es probable que exista cierto retardo en la obtención de una completa competencia funcional [173], particularmente, en ciertos grupos de pacientes con determinados factores de riesgo. Esto implica que la decisión del momento de la hepatectomía –etapa II de ALPPS- debe ser efectuada de manera más precisa, considerando no sólo criterios volumétricos sino que también funcionales [174], situación para lo cual el nivel de evidencia que haya evaluado tales aspectos aún es muy escaso.

Finalmente, cabe señalar que la complejidad del manejo de un paciente oncológico supone el empleo racional e individualizado de un conjunto de alternativas terapéuticas, tanto locales como sistémicas, que configuran un espectro de continuidad dentro del cual la técnica de ALPPS se enmarca en uno de sus extremos. Su aplicación tiene como objetivo optimizar el manejo quirúrgico oncológico de pacientes considerados límites o fuera de alcance terapéutico, ampliando las posibilidades de resecabilidad, y por consiguiente de curación. Sin

embargo, aún esta técnica constituye una cirugía de excepción para pacientes que configuran un grupo igualmente de excepción, por lo que su realización debe estar reservada a equipos médico-quirúrgicos de experiencia, con alto volumen en cirugía hepatobiliar compleja, bajo un análisis crítico, continuo y prospectivo de sus resultados idealmente dentro de protocolos de investigación.

Aunque la propiedad de regeneración hepática representa un fenómeno que nuestros antepasados intuitivamente plasmaron en la historia de la mitología griega de Prometeo, existe la paradoja del inicio de la sistematización de su estudio e incipiente entendimiento recién en las últimas décadas, donde el desarrollo de la técnica de ALPPS corresponde en la actualidad a uno de los últimos avances en cirugía hepática, que incluye un concepto desafiante al conocimiento establecido.

Así, el Prof. Thomas Starzl señalaba con motivo del incipiente avance, no exento de múltiples fracasos, que en sus inicios tuvo la cirugía de trasplante hepático: *“...progress consists of a series of great and small revolutions against authority. A great advance necessitates the overthrow of an established dogma, and when that occurs the advance itself becomes the new dogma to which advocates flock. It is natural for those disciples to become protectors instead of improvers of the status quo, guardians of the past instead of seekers of the future. To make matters formal, they might even consider creating a society which, if unaware of the dangers, could be the means by which the next stages of development were blocked”* [175].

La técnica de ALPPS constituye un avance intrínsecamente revolucionario, tanto en sus fundamentos técnicos como en sus alcances y repercusiones clínicas, donde los resultados

iniciales no deben impedir la continuación de su desarrollo; ni su consideración como un dogma, limitar o bloquear las siguientes etapas de evolución en cirugía hepática.

## **IX. Conclusión**

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que la técnica de ALPPS induce un significativo incremento de volumen del remanente hepático en un periodo menor al requerido con las técnicas de embolización y ligadura portal preoperatoria. Este incremento volumétrico tras ALPPS, ocurre mediante la inducción de mecanismos de regeneración hepática asociada a una respuesta proliferativa del tejido hepatocelular, que conserva sus propiedades funcionales globales. La ganancia de masa hepatocelular funcional observada en este contexto, está asociada a la activación de la vía de transducción de señales AMPK/mTOR, que regula la biosíntesis de macromoléculas y procesos anabólicos relacionados con el crecimiento celular.

## X. Bibliografía

1. Beckingham, I.J. and J.E. Krige, ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. *BMJ*, 2001. 322(7284): p. 477-80.
2. Martinez, C.J., et al., [Current therapeutic options for liver metastasis]. *Rev Med Chil*, 2008. 136(3): p. 376-84.
3. Winter, J. and R.A.C. Auer, Metastatic malignant liver tumors: colorectal cancer. En *Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. Elsevier Saunders, 5° edition. 2012: p. 1290-1304.e4.
4. Khan, S., D.M. Nagorney, and F.G. Que, Metastatic malignant liver tumors: neuroendocrine. En *Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. Elsevier Saunders, 5° edition. 2012. 1305-1318.e3.
5. Weitz, J. and R.P. DeMatteo, Noncolorectal nonneuroendocrine metastases. En *Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. Elsevier Saunders, 5° edition. 2012: p. 1319-1327.e2.
6. Ferlay, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015. 136(5): p. E359-86.
7. Zarate, A.J., et al., Increasing crude and adjusted mortality rates for colorectal cancer in a developing South American country. *Colorectal Dis*, 2013. 15(1): p. 47-51.
8. Norero, E., et al., [Outcome of surgical treatment of liver metastasis from colorectal cancer]. *Rev Med Chil*, 2009. 137(4): p. 487-96.
9. Tien, Y.W., et al., Simultaneous detection of colonic epithelial cells in portal venous and peripheral blood during colorectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum*, 2002. 45(1): p. 23-9.
10. Uetsuji, S., et al., Absence of colorectal cancer metastasis to the cirrhotic liver. *Am J Surg*, 1992. 164(2): p. 176-7.
11. Wang, J., M. Yang, and R.M. Hoffman, Visualizing portal vein metastatic trafficking to the liver with green fluorescent protein-expressing tumor cells. *Anticancer Res*, 2004. 24(6): p. 3699-702.
12. Norstein, J. and W. Silen, Natural history of liver metastases from colorectal carcinoma. *J Gastrointest Surg*, 1997. 1(5): p. 398-407.
13. Maithel, S.K. and M.I. D'Angelica, An update on randomized clinical trials in advanced and metastatic colorectal carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 2010. 19(1): p. 163-81.
14. Fong, Y., et al., Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*, 1999. 230(3): p. 309-18; discussion 318-21.
15. Choti, M.A., et al., Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg*, 2002. 235(6): p. 759-66.
16. Abdalla, E.K., et al., Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg*, 2004. 239(6): p. 818-25; discussion 825-7.
17. Nordlinger, B., et al., Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer*, 1996. 77(7): p. 1254-62.

18. Carpizo, D.R., et al., Liver resection for metastatic colorectal cancer in patients with concurrent extrahepatic disease: results in 127 patients treated at a single center. *Ann Surg Oncol*, 2009. 16(8): p. 2138-46.
19. DeMatteo, R.P., et al., Anatomic segmental hepatic resection is superior to wedge resection as an oncologic operation for colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg*, 2000. 4(2): p. 178-84.
20. Nordlinger, B., et al., Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. *Eur J Cancer*, 2007. 43(14): p. 2037-45.
21. Couinaud, Le foie. *Etudes Anatomiques et chirurgicales*. Paris. Mason y Cie, 1957.
22. Belgihiti J, C.P., Gadzijev E, Garden JO, Law W-Y, Makuuchi M, Strong RW Terminology Committee of the IHPBA. The Brisbane 2000 Terminology of Liver Anatomy and Resections. *HPB*, 2000. 2(3): p. 333–39.
23. Clavien, P.A., et al., Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*, 2007. 356(15): p. 1545-59.
24. Truant, S., et al., Remnant liver volume to body weight ratio  $>$  or  $=0.5\%$ : A new cut-off to estimate postoperative risks after extended resection in noncirrhotic liver. *J Am Coll Surg*, 2007. 204(1): p. 22-33.
25. Kishi, Y., et al., Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. *Ann Surg*, 2009. 250(4): p. 540-8.
26. Rahbari, N.N., et al., Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*, 2011. 149(5): p. 713-24.
27. Balzan, S., et al., The "50-50 criteria" on postoperative day 5: an accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. *Ann Surg*, 2005. 242(6): p. 824-8, discussion 828-9.
28. Rous, P. and L.D. Larimore, Relation of the portal blood to liver maintenance : a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *J Exp Med*, 1920. 31(5): p. 609-32.
29. Martins, P.N., T.P. Theruvath, and P. Neuhaus, Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*, 2008. 28(1): p. 3-11.
30. Higgins GM, A.R., Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med*, 1931. 12: p. 186–202.
31. Fortner, J.G., et al., Major hepatic resection using vascular isolation and hypothermic perfusion. *Ann Surg*, 1974. 180(4): p. 644-52.
32. Kinoshita, H., et al., Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg*, 1986. 10(5): p. 803-8.
33. Makuuchi, M., et al., Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*, 1990. 107(5): p. 521-7.
34. Adam, R., et al., Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg*, 2000. 232(6): p. 777-85.
35. Jaeck, D., et al., A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and

- bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg*, 2004. 240(6): p. 1037-49; discussion 1049-51.
36. Kianmanesh, R., et al., Right portal vein ligation: a new planned two-step all-surgical approach for complete resection of primary gastrointestinal tumors with multiple bilateral liver metastases. *J Am Coll Surg*, 2003. 197(1): p. 164-70.
  37. Abulkhir, A., et al., Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg*, 2008. 247(1): p. 49-57.
  38. Hemming, A.W., et al., Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg*, 2003. 237(5): p. 686-91; discussion 691-3.
  39. Aussilhou, B., et al., Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg*, 2008. 12(2): p. 297-303.
  40. Capussotti, L., et al., Portal vein ligation as an efficient method of increasing the future liver remnant volume in the surgical treatment of colorectal metastases. *Arch Surg*, 2008. 143(10): p. 978-82; discussion 982.
  41. Broering, D.C., et al., Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg*, 2002. 6(6): p. 905-13; discussion 913.
  42. Robles, R., et al., Comparative study of right portal vein ligation versus embolisation for induction of hypertrophy in two-stage hepatectomy for multiple bilateral colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol*, 2012. 38(7): p. 586-93.
  43. Brouquet, A., et al., High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases: response-based selection and complete resection define outcome. *J Clin Oncol*, 2011. 29(8): p. 1083-90.
  44. Ribero, D., et al., Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg*, 2007. 94(11): p. 1386-94.
  45. Kokudo, N., et al., Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology*, 2001. 34(2): p. 267-72.
  46. Heinrich, S., et al., Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol*, 2006. 45(1): p. 35-42.
  47. de Santibanes, E. and P.A. Clavien, Playing Play-Doh to prevent postoperative liver failure: the "ALPPS" approach. *Ann Surg*, 2012. 255(3): p. 415-7.
  48. Abstracts of the 9th Congress of the European-African Hepato-Pancreato-Biliary Association (E-AHPBA). April 12-16, 2011. Cape Town, South Africa. HPB (Oxford), 2011. 13 Suppl 2: p. 1-145.
  49. Schnitzbauer, A.A., et al., Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg*, 2012. 255(3): p. 405-14.
  50. Alvarez, F.A., et al., Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): tips and tricks. *J Gastrointest Surg*, 2013. 17(4): p. 814-21.
  51. Ratti, F., et al., Defining indications to ALPPS procedure: technical aspects and open issues. *Updates Surg*, 2014. 66(1): p. 41-9.
  52. Gauzolino, R., et al., The ALPPS technique for bilateral colorectal metastases: three "variations on a theme". *Updates Surg*, 2013. 65(2): p. 141-8.



53. Donati, M., G.A. Stavrou, and K.J. Oldhafer, Current position of ALPPS in the surgical landscape of CRLM treatment proposals. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(39): p. 6548-54.
54. Bertens, K.A., et al., ALPPS: Challenging the concept of unresectability - A systematic review. *Int J Surg*, 2014. 13C: p. 280-287.
55. Schadde, E., et al., ALPPS offers a better chance of complete resection in patients with primarily unresectable liver tumors compared with conventional-staged hepatectomies: results of a multicenter analysis. *World J Surg*, 2014. 38(6): p. 1510-9.
56. Knoefel, W.T., et al., In situ liver transection with portal vein ligation for rapid growth of the future liver remnant in two-stage liver resection. *Br J Surg*, 2013. 100(3): p. 388-94.
57. Nadalin, S., et al., Indications and limits for associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS). Lessons Learned from 15 cases at a single centre. *Z Gastroenterol*, 2014. 52(1): p. 35-42.
58. Asiyabola, B., et al., Operative mortality after hepatic resection: are literature-based rates broadly applicable? *J Gastrointest Surg*, 2008. 12(5): p. 842-51.
59. Belghiti, J., et al., Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. *J Am Coll Surg*, 2000. 191(1): p. 38-46.
60. Lang, H., et al., Left hepatic trisectionectomy for hepatobiliary malignancies. *J Am Coll Surg*, 2006. 203(3): p. 311-21.
61. Breitenstein, S., et al., Novel and simple preoperative score predicting complications after liver resection in noncirrhotic patients. *Ann Surg*, 2010. 252(5): p. 726-34.
62. Andriani, O.C., Long-term results with associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS). *Ann Surg*, 2012. 256(3): p. e5; author reply e16-9.
63. Li, J., et al., ALPPS in right trisectionectomy: a safe procedure to avoid postoperative liver failure? *J Gastrointest Surg*, 2013. 17(5): p. 956-61.
64. Yamashita, Y., et al., Bile leakage after hepatic resection. *Ann Surg*, 2001. 233(1): p. 45-50.
65. Nagano, Y., et al., Risk factors and management of bile leakage after hepatic resection. *World J Surg*, 2003. 27(6): p. 695-8.
66. Schadde, E., et al., Early survival and safety of ALPPS: first report of the International ALPPS Registry. *Ann Surg*, 2014. 260(5): p. 829-36; discussion 836-8.
67. Dindo, D., N. Demartines, and P.A. Clavien, Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg*, 2004. 240(2): p. 205-13.
68. Shindoh, J., et al., Analysis of the efficacy of portal vein embolization for patients with extensive liver malignancy and very low future liver remnant volume, including a comparison with the associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy approach. *J Am Coll Surg*, 2013. 217(1): p. 126-33; discussion 133-4.
69. Lam, V.W., et al., A systematic review of two-stage hepatectomy in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*, 2013. 15(7): p. 483-91.
70. de Santibanes, E., F.A. Alvarez, and V. Ardiles, How to avoid postoperative liver failure: a novel method. *World J Surg*, 2012. 36(1): p. 125-8.

71. Palmes, D. and H.U. Spiegel, Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*, 2004. 25(9): p. 1601-11.
72. Fujiyoshi, M. and M. Ozaki, Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2011. 18(1): p. 13-22.
73. Taub, R., Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(10): p. 836-47.
74. Webber, E.M., et al., Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*, 1998. 28(5): p. 1226-34.
75. Zheng, Z.Y., S.Y. Weng, and Y. Yu, Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol*, 2009. 15(46): p. 5776-83.
76. Huh, C.G., et al., Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(13): p. 4477-82.
77. Scheving, L.A., et al., Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290(1): p. 197-203.
78. Michalopoulos, G.K., Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*, 2010. 176(1): p. 2-13.
79. Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle, Liver regeneration. *Hepatology*, 2006. 43(2 Suppl 1): p. S45-53.
80. Rabes, H.M., et al., Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet*, 1976. 9(6): p. 517-32.
81. Zimmermann, A., Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. 19 Suppl 4: p. iv6-10.
82. LeCouter, J., et al., Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*, 2003. 299(5608): p. 890-3.
83. Rozga, J., B. Jeppsson, and S. Bengmark, Portal branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. *Am J Pathol*, 1986. 125(2): p. 300-8.
84. Furrer, K., et al., Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology*, 2008. 47(5): p. 1615-23.
85. Abshagen, K., C. Eipel, and B. Vollmar, A critical appraisal of the hemodynamic signal driving liver regeneration. *Langenbecks Arch Surg*, 2012. 397(4): p. 579-90.
86. Mars, W.M., et al., Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology*, 1995. 21(6): p. 1695-701.
87. Schoen, J.M., et al., Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide*, 2001. 5(5): p. 453-64.
88. Schoen, J.M. and W.W. Lutt, Nitric oxide potentiates C-Fos mRNA expression after 2/3 partial hepatectomy. *Proc West Pharmacol Soc*, 2002. 45: p. 47-8.
89. Braet, F., et al., Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress in vitro. *Comp Hepatol*, 2004. 3(1): p. 7.
90. Morsiani, E., A. Aleotti, and D. Ricci, Haemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. *J Anat*, 1998. 192 ( Pt 4): p. 507-15.

91. Mortensen, K.E., et al., Increased sinusoidal flow is not the primary stimulus to liver regeneration. *Comp Hepatol*, 2010. 9: p. 2.
92. Eipel, C., K. Abshagen, and B. Vollmar, Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited. *World J Gastroenterol*, 2010. 16(48): p. 6046-57.
93. Eipel, C., et al., Splenectomy improves survival by increasing arterial blood supply in a rat model of reduced-size liver. *Transpl Int*, 2010. 23(10): p. 998-1007.
94. Troisi, R., et al., Effects of hemi-portocaval shunts for inflow modulation on the outcome of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Am J Transplant*, 2005. 5(6): p. 1397-404.
95. Yoshizumi, T., et al., The beneficial role of simultaneous splenectomy in living donor liver transplantation in patients with small-for-size graft. *Transpl Int*, 2008. 21(9): p. 833-42.
96. Huang, J. and D.A. Rudnick, Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration. *Am J Pathol*, 2014. 184(2): p. 309-21.
97. Weymann, A., et al., p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatology*, 2009. 50(1): p. 207-15.
98. Brinkmann, A., et al., Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1978. 359(11): p. 1561-71.
99. Gazit, V., et al., Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology*, 2010. 52(6): p. 2109-17.
100. Shteyer, E., et al., Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1322-32.
101. Rudnick, D.A., et al., Serum alpha-NH-butyric acid may predict spontaneous survival in pediatric acute liver failure. *Pediatr Transplant*, 2009. 13(2): p. 223-30.
102. Cuenca, A.G., et al., Calorie restriction influences cell cycle protein expression and DNA synthesis during liver regeneration. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. 226(11): p. 1061-7.
103. Michalopoulos, G., et al., Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res*, 1982. 42(11): p. 4673-82.
104. Holecek, M., Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease. *Nutrition*, 2010. 26(5): p. 482-90.
105. Freeman, T.L., H.Q. Ngo, and M.E. Mailliard, Inhibition of system A amino acid transport and hepatocyte proliferation following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology*, 1999. 30(2): p. 437-44.
106. Moolten, F.L. and N.L. Bucher, Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science*, 1967. 158(3798): p. 272-4.
107. Skov Olsen, P., et al., Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*, 1988. 8(5): p. 992-6.
108. Berasain, C. and M.A. Avila, The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol*, 2014. 49(1): p. 9-23.
109. Berasain, C., et al., Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Crosstalks in Liver Cancer. *Cancers (Basel)*, 2011. 3(2): p. 2444-61.
110. Hay, N. and N. Sonenberg, Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 2004. 18(16): p. 1926-45.

111. Oudit, G.Y., et al., The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. 37(2): p. 449-71.
112. Wullschlegel, S., R. Loewith, and M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006. 124(3): p. 471-84.
113. Kim, D.H., et al., GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 2003. 11(4): p. 895-904.
114. Inoki, K., M.N. Corradetti, and K.L. Guan, Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet*, 2005. 37(1): p. 19-24.
115. Inoki, K., et al., TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(9): p. 648-57.
116. Inoki, K., et al., Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 2003. 17(15): p. 1829-34.
117. Dennis, P.B., et al., Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*, 2001. 294(5544): p. 1102-5.
118. Mantovani, J. and R. Roy, Re-evaluating the general(ized) roles of AMPK in cellular metabolism. *FEBS Lett*, 2011. 585(7): p. 967-72.
119. Shirwany, N.A. and M.H. Zou, AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014. 19: p. 447-74.
120. Viollet, B., et al., AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009. 196(1): p. 81-98.
121. Hardie, D.G., Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 2003. 144(12): p. 5179-83.
122. Zhang, D.X., et al., mTOR-Dependent Suppression of Remnant Liver Regeneration in Liver Failure After Massive Liver Resection in Rats. *Dig Dis Sci*, 2015.
123. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 2003. 115(5): p. 577-90.
124. Palmes, D., et al., Impact of rapamycin on liver regeneration. *Virchows Arch*, 2008. 452(5): p. 545-57.
125. Kogure, K., et al., A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 1999. 6(2): p. 171-5.
126. Yao, L., et al., Establishment of a rat model of portal vein ligation combined with in situ splitting. *PLoS One*, 2014. 9(8): p. e105511.
127. Jiang, Y.P., L.M. Ballou, and R.Z. Lin, Rapamycin-insensitive regulation of 4e-BP1 in regenerating rat liver. *J Biol Chem*, 2001. 276(14): p. 10943-51.
128. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959. 37(8): p. 911-7.
129. Deryckere, F. and F. Gannon, A one-hour minipreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques*, 1994. 16(3): p. 405.
130. Fulop, A., et al., Alterations in hepatic lobar function in regenerating rat liver. *J Surg Res*, 2015. 197(2): p. 307-17.
131. Zhou, W.C., Q.B. Zhang, and L. Qiao, Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(23): p. 7312-24.

132. Van Thiel, D.H., et al., In vivo hepatic volume determination using sonography and computed tomography. Validation and a comparison of the two techniques. *Gastroenterology*, 1985. 88(6): p. 1812-7.
133. Tsai, S., et al., Two-stage strategy for patients with extensive bilateral colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*, 2010. 12(4): p. 262-9.
134. Scholzen, T. and J. Gerdes, The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 2000. 182(3): p. 311-22.
135. Li, L.T., et al., Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*, 2015. 11(3): p. 1566-72.
136. Qie, S. and J.A. Diehl, Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)*, 2016. 94(12): p. 1313-1326.
137. Schlegel, A., et al., ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration. *Ann Surg*, 2014. 260(5): p. 839-46; discussion 846-7.
138. Wang, W., et al., AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(10): p. 3425-36.
139. Varela-Rey, M., et al., Role of AMP-activated protein kinase in the control of hepatocyte priming and proliferation during liver regeneration. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011. 236(4): p. 402-8.
140. Holecek, M., Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. *Nutrition*, 1999. 15(10): p. 784-8.
141. Mehendale, H.M., Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol*, 2005. 33(1): p. 41-51.
142. Aloia, T.A. and J.N. Vauthey, Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): what is gained and what is lost? *Ann Surg*, 2012. 256(3): p. e9; author reply e16-9.
143. Oldhafer, K.J., et al., ALPPS for patients with colorectal liver metastases: effective liver hypertrophy, but early tumor recurrence. *World J Surg*, 2014. 38(6): p. 1504-9.
144. Madoff, D.C., et al., Transhepatic ipsilateral right portal vein embolization extended to segment IV: improving hypertrophy and resection outcomes with spherical particles and coils. *J Vasc Interv Radiol*, 2005. 16(2 Pt 1): p. 215-25.
145. Kishi, Y., et al., Is embolization of segment 4 portal veins before extended right hepatectomy justified? *Surgery*, 2008. 144(5): p. 744-51.
146. Wilms, C., et al., Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann Surg*, 2008. 247(5): p. 825-34.
147. Sparrelid, E., et al., Rescue ALPPS is efficient and safe after failed portal vein occlusion in patients with colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg*, 2017. 402(1): p. 69-75.
148. Hoch, G., et al., Is intraoperative ultrasound still useful for the detection of colorectal cancer liver metastases? *HPB (Oxford)*, 2015. 17(6): p. 514-9.
149. Ferrero, A., et al., Intraoperative liver ultrasound still affects surgical strategy for patients with colorectal metastases in the modern era. *World J Surg*, 2013. 37(11): p. 2655-63.

150. Simoneau, E., et al., Next generation sequencing of progressive colorectal liver metastases after portal vein embolization. *Clin Exp Metastasis*, 2017. 34(5): p. 351-361.
151. Eshmuminov, D., et al., Meta-analysis of associating liver partition with portal vein ligation and portal vein occlusion for two-stage hepatectomy. *Br J Surg*, 2016. 103(13): p. 1768-1782.
152. Cai, Y.L., et al., An updated systematic review of the evolution of ALPPS and evaluation of its advantages and disadvantages in accordance with current evidence. *Medicine (Baltimore)*, 2016. 95(24): p. e3941.
153. Schadde, E., et al., Prediction of Mortality After ALPPS Stage-1: An Analysis of 320 Patients From the International ALPPS Registry. *Ann Surg*, 2015. 262(5): p. 780-5; discussion 785-6.
154. Linecker, M., et al., The ALPPS Risk Score: Avoiding Futile Use of ALPPS. *Ann Surg*, 2016. 264(5): p. 763-771.
155. Ho, D.W.H., et al., TSC1/2 mutations define a molecular subset of HCC with aggressive behaviour and treatment implication. *Gut*, 2017. 66(8): p. 1496-1506.
156. Vignot, S., et al., mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*, 2005. 16(4): p. 525-37.
157. Bian, J.L., et al., Benefit of everolimus in treatment of an intrahepatic cholangiocarcinoma patient with a PIK3CA mutation. *World J Gastroenterol*, 2017. 23(23): p. 4311-4316.
158. Pan, N., et al., Suppression of graft regeneration, not ischemia/reperfusion injury, is the primary cause of small-for-size syndrome after partial liver transplantation in mice. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e93636.
159. Vicente, E., et al., Is "small for size syndrome" a relatively new complication after the ALPPS procedure? *Updates Surg*, 2015. 67(3): p. 273-8.
160. Toniutto, P., et al., Current challenges and future directions for liver transplantation. *Liver Int*, 2017. 37(3): p. 317-327.
161. Steinbruck, K., et al., Monosegmental ALPPS after Bilateral Hepatectomy. *Ann Hepatol*, 2017. 16(5): p. 814-817.
162. Pineda-Solis, K., et al., Expanding the limits of resectability: Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) using monosegment 6, facilitated by an inferior right hepatic vein. *J Surg Oncol*, 2017. 115(8): p. 959-962.
163. Montalva Oron, E.M., et al., Monosegment ALPPS: A new variant of the techniques for rapid hepatic regeneration. Critical review of the initial results of our series. *Cir Esp*, 2015. 93(7): p. 436-43.
164. Schadde, E., et al., Monosegment ALPPS hepatectomy: extending resectability by rapid hypertrophy. *Surgery*, 2015. 157(4): p. 676-89.
165. Machado, M.A., et al., Total Laparoscopic Reversal ALPPS. *Ann Surg Oncol*, 2017. 24(4): p. 1048-1049.
166. Surjan, R.C., et al., First totally laparoscopic ALPPS procedure with selective hepatic artery clamping: Case report of a new technique. *Medicine (Baltimore)*, 2016. 95(29): p. e4236.
167. Vicente, E., et al., First ALPPS procedure using a total robotic approach. *Surg Oncol*, 2016. 25(4): p. 457.

168. Petrowsky, H., et al., Is partial-ALPPS safer than ALPPS? A single-center experience. *Ann Surg*, 2015. 261(4): p. e90-2.
169. Robles, R., et al., Tourniquet modification of the associating liver partition and portal ligation for staged hepatectomy procedure. *Br J Surg*, 2014. 101(9): p. 1129-34; discussion 1134.
170. Jiao, L.R., et al., A totally laparoscopic associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy assisted with radiofrequency (radiofrequency assisted liver partition with portal vein ligation) for staged liver resection. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2016. 5(4): p. 382-7.
171. Gringeri, E., et al., Laparoscopic microwave ablation and portal vein ligation for staged hepatectomy (LAPS): a minimally invasive first-step approach. *Ann Surg*, 2015. 261(2): p. e42-3.
172. de Santibanes, E., et al., Inverting the ALPPS paradigm by minimizing first stage impact: the Mini-ALPPS technique. *Langenbecks Arch Surg*, 2016. 401(4): p. 557-63.
173. Olthof, P.B., et al., Hepatobiliary scintigraphy to evaluate liver function in associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: Liver volume overestimates liver function. *Surgery*, 2017. 162(4): p. 775-783.
174. Truant, S., et al., Contribution of hepatobiliary scintigraphy in assessing ALPPS most suited timing. *Updates Surg*, 2017. 69(3): p. 411-419.
175. Starzl, T., *The Puzzle People. Memoirs of a Transplant Surgeon*. 1° ed. 1992: University of Pittsburgh Press.

## XI. Anexo

### Anexo 1. Formulario de información y consentimiento informado escrito, aprobación por comité de ética



#### Formulario de información y consentimiento informado escrito

- **Título del proyecto:** "Una nueva técnica para resecaer metástasis hepáticas en pacientes con insuficiente remanente hepático. Split in situ con ligadura portal. Mecanismos involucrados en crecimiento hepático: ¿Tensión de cizallamiento o señalización metabólica?"

#### Investigadores principales:

**Dra. Pamela Romanque Ulloa, celular 94794677**

#### Co-investigadores:

- **Dr. Mario Uribe Maturana, celular 74968319**
- **Dr. Sebastián Uribe- Echevarría Aránguiz, celular 98296076**

#### Estimado/a paciente,

Usted será sometido a una operación para extirpar las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal que lo afecta. Esta operación ha sido recomendada por su médico tratante. Nosotros estamos investigando este tipo de cáncer y por eso lo queremos invitar a participar en este protocolo de estudio que involucra la regeneración del hígado posterior a su resección hepática.

El hígado que a usted le quedaría en caso de efectuar la cirugía en un tiempo, es incompatible con la vida, es por ello que es necesario efectuar la técnica conocida como Split hepático in situ con ligadura portal.

Por favor lea este informe de consentimiento, y si está de acuerdo y acepta libre y voluntariamente participar, firme al final del documento. Si no entiende algún punto, por favor no dude en preguntar al médico o enfermera a cargo, quienes aclararán sus dudas.

#### ***¿En qué consiste el estudio?***

Las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal representan un problema relevante en nuestro país, especialmente por su mortalidad asociada. El cáncer colorrectal es la tercera causa de muerte por cáncer gastrointestinal en Chile.

Cuando las metástasis afectan el hígado de tal manera que para extirparlas se hace necesario resecaer una cantidad importante del hígado, incompatible con la vida, se utiliza una técnica estandarizada y mundialmente aceptada que permite el crecimiento del hígado remanente que no tiene metástasis evitando la insuficiencia hepática.

No se conocen completamente los mecanismos que llevan al crecimiento del remanente hepático.

#### ***¿En qué consiste la cirugía?***

Consiste en resecaer las lesiones del hígado izquierdo, ligar la vena que alimenta al hígado derecho y realizar el corte del hígado como si fuera a extraerse pero sin sacarlo del cuerpo. En una segunda cirugía, si se ha comprobado el crecimiento hepático por imágenes (Scanner), se complementará la cirugía extrayéndose el hígado derecho con tumores.

Septiembre, 2012





Esta cirugía se realiza en forma rutinaria en nuestro servicio como estándar de la cirugía para gasos como el suyo.

***¿Qué le estamos solicitando?***

Le pedimos que nos autorice a registrar, a partir de su ficha clínica algunos datos relacionados con su enfermedad. Además se tomará una muestra de sangre (10ml, equivalente a una cucharada) y un pequeño trozo del hígado remanente que se extraerá en cada cirugía (hígado afectado y no afectado). Los datos clínicos y las muestras serán estudiados en los laboratorios de la Universidad de Chile y del Hospital del Salvador. Su información y sus muestras (sangre y tumor) se mantendrán identificadas mediante un código numérico para resguardar la confidencialidad de sus datos.

***¿Quiénes tendrán acceso a la información obtenida en este estudio?***

Si bien los resultados generales de este estudio serán presentados en Congresos y publicados en revistas de salud, sus muestras de sangre, tumor e información personal serán identificadas mediante un código numérico interno del laboratorio, manteniendo el más completo anonimato de los participantes. Toda la información que Ud. aporte, será tratada de manera confidencial, de acuerdo a la ley 19.628 de 1999, sobre protección de la vida privada o protección de datos de carácter personal. No se dará a conocer su fuente, salvo que sea exigido por la justicia. Sólo tendrá acceso a ella el equipo de investigación.

Las muestras obtenidas serán utilizadas sólo para los fines de la investigación de este proyecto. Los registros de los pacientes serán cautelados por los investigadores principales (Dra. Pamela Romanque, Investigadora principal, y los Drs. Mario Uribe y Sebastián Uribe – Echevarría co-investigadores) por un período de 5 años luego de terminado el estudio.

***¿Qué beneficios y riesgos implica participar en este estudio?***

Su participación es totalmente voluntaria y no está contemplada la retribución económica ni otros beneficios directos para Ud. Los resultados del estudio por ahora sólo tienen fines de investigación y no influirán en su tratamiento. Si se obtuvieran resultados que pudieran influir en su tratamiento en el futuro, Ud. será contactado/a por los investigadores.

La muestra de sangre será tomada en pabellón cuando se le instale la vía venosa que Ud. debe tener para recibir anestesia durante su cirugía, por lo que no implica punciones adicionales. Los riesgos de la toma de muestra de sangre son mínimos y están relacionados con el dolor y posible hematoma o infección relacionados con esta punción y que debe ser realizada independiente del estudio.

La muestra de tejido hepático será obtenida por el cirujano una vez lo haya extirpado, lo que podría provocar sangrado. Sin embargo se toman todas las precauciones necesarias para prevenir esta situación en caso que ocurra. En el caso de la segunda cirugía, una de las muestras será tomada del hígado sacado del cuerpo por lo que no habría complicaciones agregadas.

***¿Qué sucede si no acepta participar?***

La participación en este estudio es libre y voluntaria. Si Ud. decide no participar, no habrá ninguna consecuencia negativa para su atención.

Se efectuará su cirugía de acuerdo a lo planificado y lo único que no se realizará será las tomas de muestras sanguíneas ni de las biopsias ya descritas.

En caso de necesitar información adicional sírvase llamar al médico coordinador del proyecto en su centro asistencial (o a los co-investigadores), que responderá a sus consultas acerca de los procedimientos relacionados con el estudio.



Si necesita hacer alguna consulta acerca de sus derechos como participante de este estudio, puede contactar a \_\_\_\_\_, Presidente del Comité de Ética de Investigación de \_\_\_\_\_, al teléfono \_\_\_\_\_.

Ud. recibirá una copia de este documento de consentimiento.



**Declaración de consentimiento informado.**

- **Título del proyecto:** "Una nueva técnica para resecaer metástasis hepáticas en pacientes con insuficiente remanente hepático. Split in situ con ligadura porLal. Mecanismos involucrados en crecimiento hepático: ¿Tensión de cizallamiento o señalización metabólica?"

• **Investigador Principal:**

- Dra. Pamela Romanque Ulloa, celular 94794677

**Co-investigadores:**

- Dr. Mario Uribe (Hospital del Salvador, celular 7-4968319)
- Dr. Sebastián Uribe Echevarría Aránguiz, celular 98296076

Si Ud. acepta participar en este estudio, por favor complete los datos siguientes y conserve una copia de este documento.

Yo, \_\_\_\_\_, Rut \_\_\_\_\_ declaro haber leído el formulario de consentimiento, haber comprendido los objetivos y procedimientos de este estudio, y haber tenido la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Doy voluntariamente mi consentimiento para participar en este protocolo de estudio sobre regeneración hepática. Entiendo que esta autorización es para que se me tome muestra de sangre, muestras de hígado y se obtengan algunos datos de mi ficha clínica. Entiendo que estas muestras serán procesadas en los laboratorios de la Universidad de Chile y Hospital del Salvador. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

<b>Profesional que interviene en el proceso de consentimiento</b>	<b>Fecha:</b> _____
_____ Nombre	_____ Rut
_____ Firma	

**Revocación de consentimiento informado**

Yo, \_\_\_\_\_, Rut \_\_\_\_\_ de forma libre y consciente he decidido retirar mi consentimiento para participar en este estudio.

\_\_\_\_\_  
Firma del pacienteNombre y Firma del testigo

## **Anexo 2.** Publicaciones y presentaciones a congresos generadas de este trabajo

### Artículo aceptado para publicación

2018: “Insight on ALPPS -Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy- mechanisms: activation of mTOR pathway”. Autores: M. Uribe, S. Uribe-Echevarría, C. Mandiola, M. Zapata, F. Riquelme, P. Romanque. HPB Journal, 2018. Artículo en prensa.

### Presentaciones en congresos y jornadas científicas

#### Congresos nacionales

2016: “Estandarización de modelo microquirúrgico experimental de ALPPS (Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy) en ratas Sprague Dawley”. Autores: C. Mandiola B., M.I. Zapata F., R. Vargas V., S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., P. Romanque U. 5° Jornada de Cirugía Hepato-bilio-pancreática. Punta Arenas, Chile. Presentación en seccional de videos maestros. Premio a mejor trabajo.

2016: “Experiencia clínica en ALPPS -Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy- en el Hospital del Salvador”. Autores: S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., F. Riquelme M., C. Mandiola B., M.I. Zapata F., P. Romanque U. LXXXIX Congreso Chileno e Internacional de Cirugía. Coquimbo-La Serena, Chile.

2016: “Aproximación a mecanismos biológicos implicados en ALPPS (Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy): activación de la vía mTOR”. Autores: C. Mandiola B., M.I. Zapata F., R. Vargas V., S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., P. Romanque U. LXXXIX Congreso Chileno e Internacional de Cirugía. Coquimbo-La Serena, Chile.

2016: “La técnica de ligadura portal y partición de parénquima hepático (ALPPS) en ratas Sprague Dawley determina un aumento significativo de masa hepatocelular funcional dependiente de la activación de la vía mTOR”. Autores: C. Mandiola B., M.I. Zapata F., R. Vargas V., S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., P. Romanque U. LXXXIX Congreso Chileno e Internacional de Cirugía. Coquimbo-La Serena, Chile.

#### Congresos internacionales

2015: “Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) single center experience in Santiago de Chile”. Autores: S. Uribe-Echevarría, M. Uribe, M.

Zapata, E. Muñoz, C. Mandiola, L. Paqui, P. Romanque. 24th Annual Conference of APASL, 2015, Istanbul, Turkey.

2015: “Hepatectomía en dos etapas con partición hepática y ligadura de la vena porta: resultados preliminares de un centro hospitalario en Santiago, Chile”. Autores: M. Uribe, S. Uribe-Echevarría, M. Zapata, C. Mandiola, F. Riquelme, P. Romanque. Congreso de la Asociación Mexicana Hepato-pancreato-biliar. Cancún, México.

2015: “Resultados preliminares de los mecanismos implicados en hepatectomía en dos etapas con partición hepática y ligadura de la vena porta: activación de la vía AMPK/mTOR”. Autores: M. Zapata, C. Mandiola, R. Vargas, M. Uribe, S. Uribe-Echevarría, E. Muñoz, P. Romanque. Congreso de la Asociación Mexicana Hepato-pancreato-biliar. Cancún, México.

2016: “Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): preliminary results of a single center experience in Santiago, Chile”. Autores: Autores: S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., F. Riquelme M., C. Mandiola B., M. Zapata F., P. Romanque U. IHPBA 2016, 12° World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. Sao Paulo, Brasil.

2016: “Preliminary insight on ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) mechanisms: activation of mTOR pathway”. Autores: C. Mandiola B., R. Vargas V., M.I. Zapata F., S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., E. Muñoz U., F. Riquelme M., P. Romanque U. IHPBA 2016, 12° World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association. Sao Paulo, Brasil.

2017: “Standardization of experimental microsurgical model of ALPPS (Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy) in Sprague Dawley rats”. Autores: C. Mandiola B., M.I. Zapata F., R. Vargas V., S. Uribe-Echevarría A., M. Uribe M., P. Romanque U. Annual Meeting AHPBA. Miami, United States.