



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

“Comparacion de la expresion de metaloproteinasa de matriz 9 y lipocalina asociado a gelatinasa de neutrofilo en pacientes con hepatocarcinoma y lesiones metastasicas en higado”

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN**

**ONCOLOGIA MÉDICA**

**PRESENTA: DRA MARIA DEL MAR GARCIA ORTEGA**

**TUTOR: DR. DANIEL MOTOLA KUBA  
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR**

**CDMX. 2017**

**médica  
SUR®**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.  | Introducción .....                                  | 4  |
| 2.  | Marco Teórico.....                                  | 4  |
|     | Hepatocarcinoma.....                                | 4  |
|     | Metastasis hepáticas.....                           | 11 |
|     | Metaloproteinasa de matriz 9.....                   | 13 |
|     | Lipocalina de neutrófilo asociada a gelatinasa..... | 15 |
| 3.  | Planteamiento del problema y justificación.....     | 17 |
| 4.  | Objetivos.....                                      | 19 |
| 5.  | Hipótesis.....                                      | 20 |
| 6.  | Diseño.....   | 21 |
| 7.  | Materiales y métodos.....                           | 21 |
| 8.  | Análisis estadístico.....                           | 27 |
| 9.  | Consideraciones éticas.....                         | 27 |
| 10. | Resultados.....                                     | 28 |
| 11. | Discusión y conclusiones.....                       | 31 |
| 12. | Referencias.....                                    | 43 |

## **1. TITULO.**

“Comparación de la expresión de metaloproteinasa de matriz 9 y lipocalina de neutrofilo asociado a gelatinasa en pacientes con hepatocarcinoma y lesiones metastásicas en hígado”

## **2. INVESTIGADORES:**

Investigador Responsable: Dr. Daniel Motola Kuba, Oncólogo Médico y profesor titular de la especialidad en oncología médica en Hospital Médica Sur

Investigador Principal: Dra. María del Mar García Ortega, residente de 3er año de la especialidad en oncología médica

Investigador(es) asociado(s):

Dr. Freddy Chablé, Patólogo adscrito al servicio de Anatomía patológica de Hospital Médica Sur

Dr. Norberto C. Chávez Tapia, Jefe de departamento de gastroenterología en Hospital Médica Sur

Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez. Oncólogo Médico adscrito a centro Oncológico Hospital médica Sur

## **3. SEDE.**

Centro Oncológico de Hospital Médica Sur y Departamento de Anatomía patológica del Hospital Médica Sur

#### **4. INTRODUCCIÓN**

El carcinoma hepatocelular es el tumor primario del hígado más frecuente, representando el 83% de las neoplasias primarias del hígado (1), siendo la quinta causa de muerte a nivel mundial (2) y séptima causa de muerte por cáncer en México. De acuerdo con Globocan, en el año 2012, en nuestro país se registraron 6,387 casos nuevos con una tasa de 5.7 por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 5.3 por cada 100,000 habitantes (3). Según la Organización Mundial de la Salud en el 2012 se registraron 782,500 casos nuevos de hepatocarcinoma con 700,000 muertes reportadas, de las cuales cerca del 50% se reportaron únicamente en China. Incluso, a pesar de que existe una disminución de la mortalidad por cáncer en múltiples patologías, la mortalidad por hepatocarcinoma continúa en aumento (4).

#### **5. MARCO TEÓRICO**

Debido a su inicio insidioso, invasión agresiva y rápida progresión, la mayor parte de los pacientes con hepatocarcinoma se diagnostican con enfermedad localmente avanzada o metastásica, ya no candidatos a resección tumoral, ablación o a trasplante. A pesar del manejo con cuidados de soporte, la supervivencia media de estos pacientes es entre 6 a 9 meses en Europa y América y de 3 a 4 meses en países asiáticos (5).

Los factores étnicos juegan un rol importante en el riesgo de padecer esta neoplasia, los japoneses, coreanos y chinos tienen mayor incidencia comparados con las poblaciones europeas o de descendencia hispana, influenciada también por el lugar de residencia, siendo mayor en japoneses que viven en Japón comparado con japoneses que viven en Estados Unidos (6). Es 2.4 veces más frecuente en hombres que en mujeres, probablemente relacionado con los niveles elevados de testosterona y mayores tasas de enfermedad hepática por etiología viral o por consumo de alcohol (6).

El hepatocarcinoma es una neoplasia que requiere de múltiples pasos y múltiples factores ambientales, exposicionales y características intrínsecas del huésped para su desarrollo. Del 70 a 80% de los pacientes tienen antecedente de infección por virus de

hepatitis B o C, sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de los pacientes infectados van a desarrollar hepatocarcinoma; lo que indica que existen otra serie de factores asociados con el desarrollo de esta neoplasia. Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto de carcinogénesis, no obstante, se considera que se debe a la inflamación crónica que estimula la carcinogénesis, daño al DNA y crecimiento de tumoral relacionado con la activación de citosinas y respuesta inmune (2).

Las neoplasias malignas epiteliales del hígado constituyen del 85 al 95% de los tumores primarios, del 6 al 12% son benignos y éstos en su mayoría son de origen epitelial. Los quistes hepáticos y la hiperplasia nodular focal son procesos no neoplásicos que pueden semejar tumores malignos. El hígado es un sitio frecuente de metástasis por el acceso a través de la vena porta, la mayor parte de los tumores metastásicos se encuentran en la periferia y, por lo general, son múltiples (6).

En el hepatocarcinoma se pueden encontrar tres patrones de distribución: masa única, nódulos multifocales diseminados o una lesión infiltrante difusa abarcando casi la totalidad del tejido hepático. Desde el punto de vista morfológico puede ser una lesión bien diferenciada hasta un tumor indiferenciado con criterios de anaplasia. Las variantes histológicas son trabecular, pseudoglandular o acinar, compacta, de células claras y fibrolaminar. Los grados de diferenciación guardan relación con la granularidad y la calidad acidófila de los hepatocitos neoplásicos, tamaño e hiper cromasia nuclear, relación núcleo-citoplasma y cohesión (4).

Los síntomas frecuentes relacionados con esta neoplasia incluyen dolor abdominal, pérdida de peso, debilidad generalizada, plenitud postprandial, anorexia, distensión abdominal, ictericia y vomito. Los datos clínicos son hepatomegalia, masa en hipocondrio derecho, ascitis, esplenomegalia, ictericia, caquexia y fiebre. La presencia de malestar general, anorexia y pérdida de peso en un paciente con diagnóstico de cirrosis debe de alertar sobre la probabilidad de hepatocarcinoma. La presencia de dolor óseo es poco frecuente (3-12%) pero es un indicador de enfermedad ósea metastásica (6).

Es un tumor altamente vascularizado el cual se puede diagnosticar con métodos no invasivos, el diagnóstico se puede realizar por medio de tomografía trifásica o resonancia magnética en nódulos mayores de 2 cm que muestren características radiológicas típicas como el reforzamiento en la fase arterial con lavado en fase venosa

tardía (5). Se debe de confirmar por histopatología las lesiones que ocurran en pacientes sin antecedente de cirrosis, o lesiones no concluyentes por imagen (5).

La alfa-fetoproteína es un marcador tumoral útil para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con hepatocarcinoma. Se encuentra elevado en 70% de los pacientes orientales con diagnóstico de hepatocarcinoma y aproximadamente el 50% de los pacientes occidentales (6). Tiene una sensibilidad para el diagnóstico de hepatocarcinoma de 41 al 65% con especificidad del 87 % (7). Se encuentran niveles elevados en el embarazo, enfermedad hepática activa, tumores embrionarios y gastrointestinales, y por lo general, los tumores pequeños y localizados no producen niveles detectables de este marcador limitando su utilidad (8).

El diagnóstico histopatológico se basa en características morfológicas y por inmunohistoquímica, el marcador glicican 3 (GPC3) que tiene una sensibilidad de 70% con especificidad de 90% y otros marcadores como HSP70 y GS (5). Suele ser positivo para citoqueratina 8 y 18, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína y fibrinógeno y negativo para citoqueratina 7, 19 y 20, antígeno de membrana epitelial y BER EP4 (4). A nivel molecular se caracteriza por amplificación de 6p21 y 11q13 así como deleciones de cromosoma 9 y con mutación frecuente en promotor TERT (60%) asociado con expresión aumentada de telomerasa. Y mutaciones en TP53 y CTNNB1 (25-30%) relacionados con activación de angiogénesis (5). Las características microscópicas incluyen elevación del radio núcleo-citoplasma, arquitectura trabecular, núcleo atípico, y envoltura endotelial periférica, la lesión pre-maligna más reconocida es la displasia (8).

El hepatocarcinoma incluye un amplio espectro de tumores con comportamientos muy variables gracias a las características propias de la lesión y por la presencia de disfunción hepática subyacente, por lo que la elección de tratamiento no se basa únicamente en el estadio clínico del tumor sino en las condiciones generales del paciente (5). Hay varios parámetros se han utilizado y han formado parte de escalas pronósticas incluyendo datos demográficos como la edad, género y estado funcional del paciente, así como los niveles de bilirrubina y albumina, presencia de ascitis o encefalopatía; y características específicas del tumor; que incluyen el tamaño tumoral, el número de lesiones, la presencia de invasión linfocelular y perineural y finalmente el tratamiento elegido tomando en cuenta dichos parámetros (9).

Se han estudiado y validado diversos marcadores tumorales, entre ellos el más usado, la alfa feto proteína ha tenido utilidad tanto diagnóstica como pronóstica. Otros marcadores relacionados con el fenotipo maligno de la lesión incluyen marcadores de proliferación celular (PCNA, ki67), P53, genes promotores de tumor (ras y c-myc) y marcadores relacionados con apoptosis, angiogenesis (VEGF, ECGF y ITDV) y adhesión celular (e-cadherina, cateninas) (9). La utilidad de estos marcadores es mayor cuando se usan en conjunto con múltiples criterios pronósticos y no únicamente cuando se toman en cuenta por separado como el Child Pugh para la función hepática, el ECOG para el estado funcional o el TNM para el tamaño tumoral (Figura 1) (9).

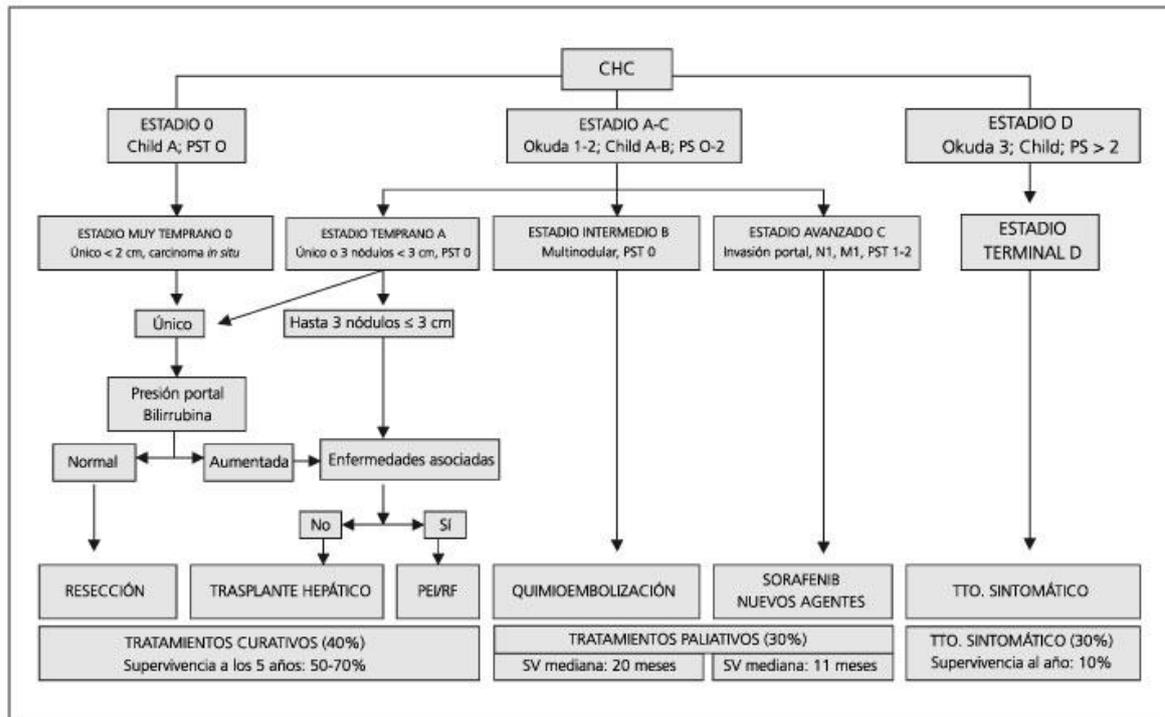
**Tabla 3.** TNM para el HCC, según las recomendaciones de AJCC/UICC y CAP (con base en AJCC/UICC TNM, 7.ª edición, febrero 2011)

|             |   |
|-------------|---|
| <b>pTX</b>  | No puede realizarse   |
| <b>pT0</b>  | No hay evidencia de tumor primario  |
| <b>pT1</b>  | Tumor solitario sin invasión vascular   |
| <b>pT2</b>  | Tumor solitario con invasión vascular o múltiples nódulos, ninguno mayor de 5 cm en su diámetro mayor                             |
| <b>pT3a</b> | Múltiples tumores mayores de 5 cm de diámetro mayor   |
| <b>pT3b</b> | Tumor único o múltiples tumores de cualquier tamaño pero que comprometen una vena portal o hepática mayor                         |
| <b>pT4</b>  | Tumores con invasión directa en los órganos adyacentes, diferentes de la vesícula biliar o con perforación del peritoneo visceral |
| <b>NX</b>   | No puede determinarse   |
| <b>N0</b>   | No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales  |
| <b>N1</b>   | Hay metástasis a cualquier número de ganglios linfáticos regionales   |
| <b>M0</b>   | No hay metástasis a distancia   |
| <b>M1</b>   | Hay metástasis a distancia  |

Duseja Ajay, Staging of hepatocellular carcinoma. Journal of clinical and experimental hepatology. 2014; 4, S74- S79.

Existen diversas clasificaciones y, entre ellas, la más utilizada es la de Barcelona Clinic Liver Cancer (BLCL) (Figura 2), así como, el algoritmo de Hong Kong Liver Cancer (HKLC), Cancer of the liver Italian Program (CLIP), Chinese University Prognostic Index (CUPI), Japan Integrated Staging (JIS) y Liver Cancer Study Group of Japan (LCSGJ) (5). De acuerdo con la clasificación de Barcelona se dividen los pacientes como categoría A o temprana, B o intermedia, C o avanzada y D o terminal. Siendo los pacientes en etapa temprana los únicos candidatos a tratamiento quirúrgico o a terapias ablativas y los pacientes en etapa intermedia a tratamiento intervencionista como TACE o radioembolización (5). Este sistema de clasificación es uno de los más usados y

validados ya que combina la función hepática del paciente, el estado funcional así como las características tumorales, permite determinar el tratamiento ideal y el pronóstico (9).



Jörg Trojan. "Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments". *Visc Med* 2016;32:116–120

Cada vez es más frecuente encontrar al diagnóstico enfermedad extra hepática (15%), relacionado con un mayor estadio intra hepático (76% E IVA), los sitios más comunes de metástasis incluyen el pulmón (55%), hueso (28%), y ganglios linfáticos abdominales (41%). El involucro de ganglios perihepáticos es un indicador de mal pronóstico, sin demostrarse hasta el momento que la linfadenectomía tenga algún papel en incrementar la supervivencia (10). El pronóstico en pacientes con enfermedad metastásica a distancia es de 21.7% a 1 año con una media de supervivencia global de 4.9 meses (9).

Existen diferentes opciones para el tratamiento del hepatocarcinoma que van desde el tratamiento paliativo hasta opciones potencialmente curativas. Aunque la resección es el pilar del tratamiento, únicamente se logra en menos del 5% de los pacientes, e incluso con un tratamiento curativo el riesgo de recurrencia o progresión de la enfermedad hepática es inminente (11).

El trasplante hepático y la resección quirúrgica son las terapias más efectivas en pacientes con tumores pequeños, siendo más costo/efectiva la resección y con la ventaja de tratar la enfermedad hepática subyacente en pacientes en los que se realiza trasplante. En pacientes con cirrosis en etapa A, según Barcelona, se asocia a los mejores resultados en términos de supervivencia, es un tratamiento potencialmente curativo y la mejor opción para pacientes con cirrosis descompensada. Los criterios de Milan (tumor único menor 5 cm y menos de 3 tumores menores de 3 cm) conducen a una tasa de supervivencia global a 5 años de 75% y tasa de recaída de menos del 15% (12, 13).

Dentro de las opciones para tratamiento local se incluye la ablación por radiofrecuencia, inyección percutánea de alcohol, inyección percutánea de ácido acético, crioablación, ablación por micro ondas, terapia foto dinámica, embolización transarterial, quimio-embolización transarterial, radio-embolización transarterial, y radiocirugía. La elección entre tan diverso arsenal de terapias locales depende de las características del paciente, del tumor, así como la accesibilidad de cada centro de atención (11).

Actualmente el tratamiento sistémico de elección para pacientes con enfermedad metastásica o enfermedad avanzada es a base del inhibidores tirosino cinasa como el Sorafenib, con actividad contra VEGFR-2, PDGFR, BRAF, c-Kit, y p38; únicamente aprobado para el tratamiento de pacientes con buen estado funcional y con enfermedad hepática en Child Pugh A con respuesta clínica limitada, y un amplio perfil de toxicidad (4, 5). En el estudio Sharp se demostró un aumento en supervivencia global comparado con placebo de 10.7 meses contra 7.9 meses. En el estudio asiático se demostró beneficio comparado contra placebo en supervivencia global de 6.5 vs 4.2 meses (14, 15).

También se ha utilizado el Sorafenib en combinación con quimioterapia con el objeto de incrementar eficacia con resultados contradictorios entre los que se incluyen estudios con doxorubicina, oxaliplatino, tegafur/uracilo, cisplatino y gemcitabina (12). Otros inhibidores tirosina cinasa como sunitinib, erlotinib, linifanib y brivanib se han probado en estudios fase III con resultados diversos (12). Se encuentran en proceso estudios fase III para el uso de inhibidores tirosino cinasa en hepatocarcinoma avanzado como el Regorafenib y Lenvatinib con estudios fase II con respuestas prometedoras. Y la inmunoterapia, ampliamente utilizada en otras neoplasias con resultados satisfactorios, ha tenido utilidad limitada en hepatocarcinoma, con estudios fase II en

segunda línea con 5% de respuestas completas y 17% de respuestas parciales con adecuado perfil de toxicidad (4).

El riesgo de recaída o segundo primario es alto incluso con trasplante hepático, 30 al 50% de los pacientes con hepatocarcinoma recaen en los primeros dos años tras tratamiento, y 20% más 3 años después, en pacientes que se manejaron con resección hepática o tratamientos locales el riesgo llega a ser hasta del 70% en los dos primeros años. Una tercera parte de los pacientes con recurrencia son candidatos a tratamiento local potencialmente curativo por lo que, la vigilancia estrecha y el diagnóstico importante, son cruciales (11).

### **Metástasis hepáticas**

La enfermedad metastásica por cáncer es un factor importante para evitar el manejo exitoso del cáncer y permanece como uno de los factores pronósticos más importantes (16, 17). El hígado, después de los ganglios linfáticos, es el sitio principal para el desarrollo de enfermedad metastásica, muy frecuente en neoplasias gastrointestinales así como en cáncer de mama (21%) cáncer de cérvix y melanoma. Esta afinidad por el tejido hepático está dada principalmente por la distribución de la vasculatura, así como por los grupos celulares específicos que se encuentra la célula maligna circulante en su paso por el microambiente hepático como las células endoteliales sinusoidales, los hepatocitos, las células de Kupffer, las células dendríticas, citosinas, factores de crecimiento y angiogénesis (VEGF, IL8, integrinas, PD-ECGF, TSP 1 Y TSP 2) (16, 17).

La presencia de células tumorales circulantes en plasma se ha relacionado con la presencia de enfermedad metastásica incluso previo a que sea evidente en estudios de imagen, CTC mayores de 5 en 7.5 ml de sangre proporciona un estimado de pronóstico y riesgo de enfermedad diseminada (17). El desarrollo de metástasis hepáticas se da en cuatro fases principalmente, la fase microvascular, la fase extravascular, la fase angiogenica y la fase de crecimiento tumoral (17)

Igualmente, los neutrófilos, pueden promover la aparición de metástasis., gracias a su habilidad de unirse a las células tumorales e incrementar su poder de invasión al unirse y degradarse en la micro vasculatura y dañar el endotelio sinusoidal. La producción de MMP9 y elastasa contribuye a la formación de metástasis al favorecer la transmigración de células tumorales y la expansión tumoral. De igual forma, las

metaloproteinasas de matriz junto con citosinas y factores de crecimiento contribuyen al reclutamiento de las células endoteliales y angiogénesis, la formación y cambio de la matriz extracelular, invasión de células tumorales y proliferación (18).

En la actualidad, el único manejo potencialmente curativo para la presencia de metástasis hepáticas es la resección, sin embargo, éste se logra únicamente en un porcentaje pequeño de pacientes (27 a 39%) y sólo en el 20% será curativo; asociado además a una morbi mortalidad importante por el procedimiento (17). Más del 50% de los pacientes con cáncer colorectal desarrollan enfermedad metastásica hepática en el curso de su enfermedad y será la causa de muerte en 2/3 de los pacientes. Ahora el tratamiento de elección para las lesiones potencialmente resecables es el manejo quirúrgico, sin embargo, a pesar de tratamientos sistémico adyuvante, hasta el 70% de los pacientes van a presentar recaída. Se han desarrollado terapias locales que pueden mejorar desenlaces como la quimioterapia intraarterial (19).

El beneficio de la resección en pacientes con metástasis no colo rectales y no neuroendócrinas aún no se ha probado. Existen un número de estudios que han demostrado cierto beneficio en pacientes bien seleccionados con resecciones técnicamente factibles; sin embargo, es necesario además, tomar en consideración ciertos factores pronósticos como la biología del tumor primario, la presencia de enfermedad extra hepática y la respuesta de la enfermedad al tratamiento sistémico (20). Para estos pacientes existen tratamientos paliativos locales que incluyen ablación o embolización en combinación con tratamiento sistémico (20).

### **Metaloproteinasas de matriz - 9**

Las metaloproteinasas de matriz son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que comparten múltiples características estructurales y funcionales, sin embargo, cuentan con especificidades diferentes. Existen 24 miembros de la familia de metaloproteinasas que se han agrupado en cuatro grupos diferentes de acuerdo con las características estructurales y funcionales de las mismas: Colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y asociadas a membrana. (21) Se relacionan con múltiples procesos fisiológicos como el crecimiento celular, desarrollo y remodelamiento de tejidos, angiogénesis, procesos inflamatorios y se ha vinculado además con el desarrollo de cáncer. Se conoce además que el aumento de la expresión de metaloproteinasas se relaciona con factores de mal pronóstico como estadio avanzado al diagnóstico,

metástasis y. por lo tanto, con una disminución de la supervivencia, directamente relacionado con su habilidad para degradar la membrana basal y favorecer la invasión. (21, 22)

Los cambios en la matriz extra celular en el hígado normal dependen del equilibrio entre la síntesis de matriz extracelular y la proteólisis mediada por metaloproteinasas, en tejido normal se encuentran por lo general niveles bajos de metaloproteinasas principalmente 1, 2, 3, 11, 13 sin embargo, no se encuentran niveles detectables de la metaloproteinasa 9. La metaloproteinasa 2 se ha relacionado también con la formación de vasos sanguíneos y la atracción de citosinas. Por lo contrario, la Metaloproteinasa 9 se ha encontrado expresada en tejido hepático que sufre de daño crónico y fibrosis por diferentes factores como el hígado graso, el alcoholismo y la infección viral y forma parte de la activación de neutrófilos en daño agudo (23).

El microambiente tumoral hepático es una mezcla de diferentes células tumorales en la matriz extracelular, células del estroma y las proteínas que forman que contribuyen al proceso de carcinogénesis. Las células de Ito son pericitos que se encuentran en el espacio perisinusoidal y se activan como respuesta a diferentes hepatotoxinas o a infecciones virales favoreciendo la formación de fibrosis al inducir el desarrollo de miofibroblastos (24). El incremento en el número de estas células se relaciona con el remodelamiento, el depósito de células tumorales así como la expresión aberrante de factores de crecimiento en el micro ambiente tumoral. La proliferación de este grupo celular se debe en parte a la expresión de MMP9 y la cinasa de adhesión focal (FAK) y las interacciones entre ellas mismas (24).

Se han identificado múltiples vías relacionadas al aumento de expresión de MMP, en específico 2 y 9, que le confieren su capacidad de suprimir apoptosis y favorecer el crecimiento celular, entre las que se encuentra la vía de AKT, que se presenta hiperactivada de forma aberrante y se ha relacionado con aumento en los niveles de metaloproteinasas en pacientes con hepatocarcinoma. (25) Se conoce además opuestos niveles de regulación con EFEMP1, facilitado por la vía de ERK 1 / 2 Y relacionado con mayor invasión vascular, estadio al diagnóstico y grado tumoral (26). MACC1 y C-met favorece regulación a la baja de MMP2 y MMP9 y el silenciamiento de los mismos favorece progresión y metástasis (27). Y como en otras neoplasias, se ha relacionado MAPK. (22)

En pacientes con hepatocarcinoma se ha identificado la expresión de MMP2 y MMP9 como factores predictivos de progresión local y a distancia, y la expresión de MMP9 con recurrencia temprana tras resección. En estudios previos se ha encontrado una mayor prevalencia en pacientes con invasión portal por lo que se considera como un factor predictivo de enfermedad metastásica y se ha determinado que pudiera existir un papel en la inhibición del mismo como parte del tratamiento de la enfermedad localizada. (21)

La formación de metástasis hepáticas requiere de la degradación de la membrana basal, proceso que se logra gracias a múltiples enzimas proteolíticas dentro de las que se incluyen las metaloproteinasas de matriz así como ciertas endopeptidasas. En ciertos estudios en ratones se ha demostrado que el transferir metaloproteinasa de matriz 9 favorece la aparición de enfermedad metastásica, Zeng analizó por Western Blot muestras de metástasis hepáticas por cáncer colorectal y tejido sano circundante las cuales presentaban pro-MMP9, y encontró que los niveles de MMP9 se encuentran sobre expresados únicamente en el tejido tumoral, sin encontrarse el mismo comportamiento en tejido hepático sano circundante, se determinó además que esta sobre expresión no era uniforme a todo el tejido tumoral, lo cual se podría explicar por la presencia de diferentes vías que contribuyen a la formación de metástasis no relacionadas con las metaloproteinasas (28). En el estudio de Illemann, en el que se comparó la expresión de MMP9 en pacientes con cáncer colorectal metastásico en lesión primaria, en las lesiones hepáticas y en los ganglios invadidos, encontraron que los macrófagos en las lesiones metastásicas rara vez expresan MMP9 comparado con los niveles elevados encontrados en la lesión primaria y en ganglios linfáticos invadidos, este hallazgo sugiere que las células malignas se diseminan en el tejido hepático por medio de diferentes mecanismos proteolíticos los cuales se determinan por el medio celular local y extra celular (29).

### **Lipocaina asociada a gelatinasa asociada a neutrofilos**

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, también conocida como lipocalina-2, es una proteína de 21 kDa pertenece a la superfamilia de las lipocalinas, que a su vez incluyen cerca de 20 lipoproteínas pequeñas que interactúan con diferentes ligandos que comparten estructura tridimensional rodeando un cajón central, el cual determina la función específica de cada lipocalina para que actúen como

transportadores para sustancias hidrófobas así como prostaglandinas, retinoides, ácido araquidónico, ácidos grasos y hormonas (30). La principal función de NGAL es capturar las partículas de hierro y transportarlas al interior de la célula al interactuar con receptores específicos en la membrana celular ocasionado un incremento intracitoplasmático del mismo. Por otra parte, es una proteína de “estrés” inducida e hiper producida por múltiples subtipos celulares posterior a la exposición a ciertas condiciones de estrés probablemente relacionada a su capacidad de activar mecanismos de defensa asociados al hierro (30).

La evaluación de niveles urinarios y plasmáticos de esta proteína ha sido especialmente útil como marcador de daño orgánico temprano en múltiples patologías. De igual forma, se ha relacionado la actividad de NGAL con los procesos de crecimiento, diferenciación y multiplicación celular, teniendo una relación estrecha con los procesos de diferenciación y proliferación en múltiples tumores humanos al interactuar con factores de crecimiento como factor de crecimiento del hepatocito, factor transformador y ácido retinoico (30).

En diversos estudios se ha observado que la expresión aumentada de mRNA y los niveles de proteína de NGAL se encuentran presentes en tejido mamario en pacientes con cáncer de mama pero en niveles casi indetectables en el tejido sano circundante. De acuerdo con el trabajo de Stoesz (31), se demostró una relación directa entre la expresión aumentada de NGAL con indicadores de mal pronóstico en tumores mamarios, como pobre diferenciación, presencia de ganglios positivos y un alto índice mitótico, así como una relación inversamente proporcional entre la expresión y la supervivencia global y tiempo a la recaída (31). Parece ser que la cualidad de modular la proliferación celular se deriva de su capacidad para interactuar con la metaloproteinasa de matriz -9 (MMP9) aumentando su función en el desarrollo de metástasis. Al formar un complejo NGAL/MMP9 se evita la degradación de MMP9, aumentando su actividad e incrementando el riesgo de invasión y capacidad de metástasis tumoral (30).

De la misma forma se ha demostrado su relación con otras neoplasias aparte de los tumores mamarios, ya que el patrón de crecimiento mediado por NGAL/MMP9 pudiera tener un patrón crucial en el desarrollo de diferentes neoplasias como diversos tumores en SNC, vejiga, tiroides e incluso diferentes tumores gastrointestinales como esófago, gástrico, páncreas y colon (30). Además, se ha demostrado que existen

mecanismos independientes de su relación con MMP9 que permiten que NGAL active otras vías de señalización asociadas con la proliferación celular.

En el caso de cáncer de esófago, Fang et al (32), demostró que las células tumorales tienen la capacidad de expresar receptores NGALR-3 que activan vías de crecimiento (32). Existe otro estudio en pacientes con cáncer de esófago escamoso donde se encontró expresión de NGAL en el 50% de los pacientes demostrando una disminución en la supervivencia a 5 años de 33.2% vs 49.8% ( $p < 0.00001$ ), así como relación con factores de mal pronóstico como grado tumoral, tamaño tumoral y localización, sin encontrar una correlación positiva con características clínicas (33).

Zhang et al identificaron de manera retrospectiva, en 138 pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma, la expresión de NGAL y RINGAL, y lo correlacionaron con características clínicas y con la supervivencia. De los 138 casos se encontró altamente expresado NGAL en 73.9% de los pacientes y RINGAL en 68.8% y en la combinación NGAL/RINGAL en 66.6%. La correlación de la sobre expresión fue mayor en pacientes con estadios avanzados al diagnóstico, invasión vascular y con recurrencia tumoral, y en pacientes con antecedente de cirrosis. En el análisis univariado y multivariado se encontró que los pacientes con sobre expresión de NGAL, y RINGAL la supervivencia global fue menor ( $p < 0.0001$ ), sobre todo en el subgrupo de pacientes con NGAL (+)/ RINGAL (+). No se encontró diferencia significativa con alguna otra característica clínica (2).

En el estudio de Baressi se comparó la expresión por inmunohistoquímica de NGAL en pacientes con tumores en SNC primarios y en lesiones metastásicas, y se encontró expresión positiva en pacientes con lesiones de alto grado (glioblastomas y oligoastrocitomas), sin evidencia de inmuno-expresión en el resto de tumores primarios o en las lesiones metastásicas. Lo que sugiere que la expresión de esta proteína se restringe a tumores de alto grado con peor pronóstico (34).

En el estudio de Candido se revisaron los patrones de expresión genética en diferentes bases de datos y se encontró una mayor expresión en tejido tumoral comparado con tejido normal circundante en diferentes tumores sólidos, de igual forma en todos los estudios que compararon expresión entre el tumor primario y las lesiones metastásicas, fue significativamente superior la expresión para el tumor primario. Se cree que esta disminución en la expresión en lesiones metastásicas pudiera ser secundaria a la inactivación de la vía del gen de NGAL durante la diseminación a

distancia del tumor. Los tumores que han demostrado mayor expresión de NGAL (por encima de la percentila 75) son los tumores ováricos, tiroides, hepatocarcinoma, colon, riñón, pulmón, páncreas y vejiga y los tumores con menor expresión (por debajo de la percentila 25) son los tumores hematológicos, cabeza y cuello, esófago y cervicouterino (35).

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

En la actualidad no existen marcadores moleculares que permitan clasificar a los pacientes con esta neoplasia de acuerdo con pronóstico, únicamente se cuentan con características clínicas y patológicas que permiten predecir desenlaces.

La expresión de las proteínas MMP9 y NGAL se ha relacionado con los procesos de crecimiento, diferenciación y multiplicación celular en tumores humanos al interactuar con factores de crecimiento como factor de crecimiento del hepatocito, factor transformador y ácido retinoico. En algunos tumores se ha asociado su expresión con factores de mal pronóstico como diseminación ganglionar, crecimiento tumoral, pobre diferenciación y alto índice mitótico.

Existe escasa información acerca del porcentaje de pacientes con hepatocarcinoma que expresan Metaloproteinasa de Matriz 9 y lipocalina de neutrofilo asociada a gelatinasa, así como su relación con el pronóstico, y las características clínico patológicas relacionadas con la expresión de estos marcadores. La identificación del impacto en el desenlace de estos pacientes nos permite predecir una población de peor pronóstico en un tumor que por sus características conlleva, desde el diagnóstico, un comportamiento agresivo con opciones limitadas para el tratamiento sistémico en un grupo de pacientes que en su mayoría presentan antecedente de cirrosis ya con secuelas secundarias a la patología de base.

La comparación de la expresión de MMP9 y NGAL en metástasis hepáticas con el de hepatocarcinoma nos permite conocer marcadores pronósticos relacionados con un tumor con características más agresivas, y diferenciar marcadores en el proceso de carcinogénesis.

Se ha demostrado diferencias significativas entre la expresión de MMP9 y NGAL en diversos tumores primarios y sus respectivas lesiones metastásicas, aparentemente por la inactivación de diferentes vías relacionadas con NGAL, sin embargo no se ha

comparado la expresión entre un tumor primario de hígado y lesiones metastásicas hepáticas.

## **7. JUSTIFICACIÓN.**

En la actualidad no existen marcadores moleculares efectivos que permitan clasificar a los pacientes con esta neoplasia de acuerdo con pronóstico, se han desarrollado diversos estudios con la finalidad de establecer dichos marcadores al analizar múltiples vías relacionadas con la proliferación celular sin resultados exitosos por lo que únicamente se cuentan con características clínicas y patológicas que permiten predecir desenlaces.

Se cuenta con múltiples estudios previos que han identificado la expresión de NGAL y MMP9 como factores pronósticos en diversos tumores por su relación con factores de crecimiento, diseminación local y a distancia y grado de diferenciación, sin embargo, sólo existe un estudio previo en población oriental en que se ha buscado la expresión de NGAL en pacientes con hepatocarcinoma y existen estudios que han explorado la expresión de MMP9 y su impacto en el pronóstico pero pocos han analizado la relación entre la expresión de MMP9 y NGAL. No existe información sobre la prevalencia de expresión de MMP9 y NGAL en nuestra población ni su impacto en el pronóstico, así como su relación con características clinicopatológicas. De igual forma, existen estudios previos que han comparado la expresión de estos marcadores en tejido sano comparado con tejido tumoral como es el caso de cáncer de mama, sin embargo, no existen estudios que hayan comparado la expresión en muestras de hepatocarcinoma y expresión en lesiones metastásicas.

El identificar diferentes marcadores en tumores con opciones de tratamiento limitadas, como es el caso del hepatocarcinoma, nos permite ampliar el conocimiento acerca de la agresividad del mismo y sus patrones de diseminación y, además, permite plantear el terreno para el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento. La expresión de estas proteínas se identifica en una muestra de tumor, es factible su reproducción y permite seleccionar a un subgrupo de pacientes que presentan características más agresivas con un potencial impacto terapéutico.

Existen estudios previos que han demostrado niveles menores de expresión en pacientes con lesiones metastásicas comparados con la lesión primaria, sin embargo no existe un estudio específico que haya comparado en tejido hepático la diferencia de expresión entre un tumor primario de hígado como es el hepatocarcinoma y lesiones metastásicas.

## **8. OBJETIVO.**

### Primario

1. Comparar el porcentaje de expresión de Metaloproteinasa de matriz 9 y lipocalina de neutrófilo asociado a gelatinasa entre hepatocarcinoma y metástasis hepáticas

### Secundarios

2. Determinar la expresión de MMP9 y NGAL en pacientes con diagnóstico de carcinoma hepatocelular y su relación con características de mal pronóstico
3. Correlacionar la expresión de MMP9 y NGAL en hepatocarcinoma con características clínicas
4. Correlacionar la expresión de MMP9 y NGAL en hepatocarcinoma con características histopatológicas

## **9. HIPÓTESIS.**

### 9.2 HIPOTENSIS NULA

La expresión de metaloproteinasa de matriz 9 y lipocalina de neutrófilo asociada a gelatinasa en hepatocarcinoma no es mayor que en lesiones metastásicas en hígado.

### 9.3 HIPOTESIS ALTERNA

La expresión de metaloproteinasa de matriz 9 y lipocalina de neutrófilo asociada a gelatinasa en hepatocarcinoma es mayor que en lesiones metastásicas en hígado.

## **10. DISEÑO.**

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional, no aleatorizado, en Centro Oncológico Integral “Diana Laura Riojas de Colosio” en conjunto con el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Médica Sur. Se revisaran los casos de expedientes con diagnóstico de hepatocarcinoma y lesiones metastásicas en hígado del 1 de Enero del 2005 al 01 de Julio del 2017.

## **11. MATERIALES Y MÉTODO.**

11.1. Universo de estudio. Población de estudio.- Pacientes con diagnóstico por patología de hepatocarcinoma y lesiones metastásicas en hígado que cuentan con material para realizar inmunohistoquímica en servicio de patología de hospital Médica Sur

### 11.2 Tamaño de la muestra

Se realizara por conveniencia de manera no probabilística, teniendo en cuenta que el teorema de limite central nos dicta que requerimos un mínimo de 30 pacientes por brazo de estudio para realizará estadística inferencial.

No se puede realizar calcular tamaño de muestra ya que se desconoce la proporción de expresión en el tejido a estudiar

Sin embargo en el supuesto de que basándonos en evidencia previa, existe una expresión del 73% de NGAL en hepatocarcinoma y la poca información que existe en otros tumores metastásicos la expresión es baja con la fórmula de diferencia de proporciones, con un nivel de confianza del 95%, potencia de 80%, se requieren 33 pacientes por cada grupo, más 10% de perdidas, se requieren 37 pacientes por grupo.

11.3 Muestreo no probabilístico, consecutivo.

#### 11.4. Criterios de Selección:

##### 11.4.1. Criterios de Inclusión.

Pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma, y lesiones metastásicas en hígado por patología que cuenten con material para realizar inmunohistoquímica en departamento de patología de hospital Médica Sur, mayores de 18 años de edad.

##### 11.4.2. Criterios de exclusión.

Pacientes que no cuenten con diagnóstico de hepatocarcinoma y lesiones metastásicas en hígado por patología

Pacientes menores de 18 años

##### 11.4.3 Criterios de eliminación.

Pacientes que no cuenten con material suficiente para realizar inmunohistoquímica

Pacientes que no cuentan con expediente físico o electrónico para recabar datos clínicos

#### 11.5. Definición de variables

Se determinaron variables clínicas que incluyeron:

- Genero: Mujer/Hombre
- Edad al diagnóstico- Años
- Fecha de diagnóstico- dd/mm/aaaa
- Niveles de alfafetoproteína- UI/ml
- Tipo de lesión: Hepatocarcinoma, lesión metastásica en hígado
- Localización de tumor primario: Colon, pancreas

- Estadio según Barcelona- A, B, C o D
- Child Pugh- A, B o C
- Hígado cirrótico o hígado sano
- Causas de cirrosis-Viral, criptogénica, alcohol, hígado graso o autoinmune
- Infección por VHC o VHB- Presente o ausente
- Tratamiento recibido
  - Tratamiento local (TACE, quimioembolización, resección)
  - Tratamiento sistémico (Inhibidores tirosin cinasa, quimioterapia)
- Fecha del último seguimiento- dd/mm/aaaa

Se realizó inmunohistoquímica para:

- Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
- Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9)

#### 11.6. Descripción de procedimientos.

Se obtuvo de una base de datos del servicio de Anatomía patológica, todos los números de registro de pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma desde el primero de enero del 2005 al 01 de Julio del 2017 y se tomaron al azar el mismo número de muestras en pacientes con diagnóstico de lesiones metastásicas a hígado con primario en colon o páncreas, se verificó que contaran con material suficiente y se realizó inmunohistoquímica para MMP9 y NGAL.

Se obtuvo por medio de expediente electrónico y expediente físico los datos clínicos del paciente: Género, edad al diagnóstico, registro, fecha de nacimiento, fecha de diagnóstico, tamaño tumoral al diagnóstico, estadio al diagnóstico según BCLC, tumor primario, fecha último registro, infección por VHB, infección por VHC, diagnóstico de cirrosis, tratamiento local, fecha de inicio de tratamiento local, tratamiento sistémico, tipo de tratamiento sistémico, fecha de inicio de tratamiento sistémico, niveles de alfa feto proteína.

Se realizó inmunohistoquímica para:

1. Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)
2. Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9)

### **Técnica de inmunohistoquímica**

Se obtuvieron los bloques en parafina de las biopsias encontradas y se realizaron cortes de 4 micras de espesor. Se colocaron en laminillas electro cargadas Fisherbrand (Fisher Scientific), las cuales se calentaron en la estufa de secado a una temperatura de 60 grados por 35 minutos. Posteriormente se desparafinaron y rehidrataron con baños en el orden siguiente; xilol, etanol absoluto, alcohol al 96% y agua destilada. Se colocaron las laminillas con los cortes mencionados en solución amortiguadora (buffer) de citratos, se calentaron a presión durante dos minutos y una vez enfriados a temperatura ambiente se lavaron con agua destilada y se colocaron en el rack para añadir solución buffer de fosfatos (PBS) para realizar lavados. Se añadió peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% para inactivar los sitios inespecíficos de unión a anticuerpos durante 6 minutos y se lavó posteriormente tres veces con PBS con secado con papel absorbente. Las inmuno-tinciones se realizaron utilizando el método estándar de avidina – peroxidasa. Los siguientes anticuerpos fueron estudiados con sus controles apropiados: se añadieron los anticuerpos diluidos en solución especial para este efecto (BSB 0105, BioSB Inc.). Se usaron anticuerpos anti lipocalina-2 (GTX63306, GeneTex Inc.) y anti metaloproteinasa 9 (GTX100458, GeneTex Inc.) Se dejó incubar el anticuerpo por 55 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se retiró con papel absorbente, se lavaron tres veces las laminillas con PBS y se aplicó un sistema de detención de marca (BSB 0007, BioSB Inc.). Se incubaron con biotina por 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS.

Seguido de esto se incubaron con estreptovidina por otros 10 minutos y se lavaron de nuevo con PBS. Para el revelado de las tinciones con el anticuerpo se añadió diaminobenzidina de manera manual, observando al microscopio óptico para evitar la sobreexposición de la tinción. Se sumergieron en agua las laminillas para posteriormente añadir hematoxilina por 15 segundos. Se lavaron de nuevo las laminillas con agua y se sumergieron en solución de carbonato de litio para “virar” la hematoxilina. Se deshidrataron con baños consecutivos en el siguiente orden: alcohol al 96%, etanol

absoluto, y xilol por dos minutos cada uno. Se montaron en resina permanente para microscopia y se colocaron cubreobjetos para su valoración por un patólogo experto.

| <b>ANTICUERPO</b> | <b>CLONA</b> | <b>MARCA</b> | <b>DILUCIÓN</b> |
|-------------------|--------------|--------------|-----------------|
| <b>NGAL</b>       | EPR5084      | GeneTex      | 1:200           |
| <b>MMP9</b>       | N2C1         | GeneTex      | 1:50            |

#### Interpretación de los anticuerpos

Para registrar la positividad de las inmuno – reacciones se usó un sistema cualitativo y cuantitativo determinado por la observación directa al microscopio de luz. Para evaluar la efectividad de los anticuerpos se valoró que los testigos marcaran adecuadamente en cada laminilla. El tejido utilizado como testigo para evaluar la positividad de NGAL-2 fue la tinción intensa (3+) en el citoplasma de las células glandulares del endo – cervix. El testigo utilizado para evaluar la reactividad de MMP-9 fue la positividad intensa (3+) en el citoplasma de macrófagos alveolares. Se utilizó una escala de 1+ para una tinción débil hasta 3+ para una tinción muy intensa, para ambos anticuerpos en el citoplasma de las células tumorales. De la misma forma, en cada caso se determinó el porcentaje de las células neoplásicas que mostraron positividad débil a intensa.

1. Hoja de captura de datos.

Se codificaron a los pacientes incluidos en el estudio de tal manera que solo investigadores conocen datos personales para mantener confidencialidad de los mismos. **(Anexo 1)**

#### 11.9. Calendario.

- a) Revisión bibliográfica indique el tiempo que invertirá 1 mes
- b) Elaboración del protocolo: 1 mes

- c) Obtención de la información. 1 mes
- d) Procesamiento y análisis de los datos. 1 semana
- e) Elaboración del informe técnico final. 1 mes
- f) Divulgación de los resultados. 3 meses

Fecha de inicio: Noviembre de 2016. Fecha de terminación: Julio del 2017

#### 11.10. Recursos.

##### 11.10. 1. Recursos Humanos.

Investigador: María del Mar García Ortega

Actividad: Revisión bibliográfica, elaboración de protocolo, análisis de resultados, elaboración de informe técnico final

Número de horas por semana 5 horas por semana

Investigador: Daniel Motola Kuba

Actividad: Elaboración de protocolo, análisis de datos, divulgación de los resultados

Número de horas por semana 2 horas por semana

Investigador: Freddy Chablé Montero

Actividad: Obtención de los resultados

Número de horas por semana: 2 horas

Investigador: Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez

Actividad: Análisis estadístico

Número de horas por semana: 2 horas

#### 11. 11 Recursos materiales

Se requiere material para realizar inmunohistoquímica para MMP9 y NGAL

Se utilizaron anticuerpos anti lipocalina-2 (GTX63306, GeneTex Inc.) y anti metaloproteína 9 (GTX100458, GeneTex Inc.)

## 11.12 Recursos financieros

Los costos del protocolo correrán a cargo de los investigadores

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó programa SPSS versión 19 para análisis estadístico. Las variables continuas para fines descriptivos fueron agrupadas como medias y medianas aritméticas y desviaciones estándar. Las variables categóricas consistieron en porcentajes con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Las comparaciones inferenciales se hicieron utilizando la prueba t de student o la prueba U de Mann-Whitney. La prueba exacta de Fisher se utilizó para evaluar la significancia estadística de las variables categóricas determinado como  $P < 0.05$ . Las variables estadísticamente significativas y limítrofes ( $P < 0.01$ ) se incluyeron en el análisis multivariado de regresión logística. La supervivencia global se analizó por medio del método de Kaplan- Meier mientras que en las comparaciones entre los subgrupos se analizaron utilizando log Rank o prueba de Breslow, si las dos curvas de supervivencia se cruzaban. Para al análisis de la curva de supervivencia, todas las variables se dicotomizaron. La significancia estadística se determinó con una  $P < 0.05$ .

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado. Ej.- Cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos, etc. En los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

No requiere de consentimiento informado ya que se trata de un análisis retrospectivo, se tomó información de expediente electrónico de pacientes que en su mayoría ya fallecieron.

## 12. RESULTADOS

### Características generales de la población

Se obtuvo información de 109 pacientes en total, 65 pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma y 48 pacientes con diagnóstico de metástasis de adenocarcinoma de los cuales 14 tenían tumor primario en colon, 30 en páncreas y otros 4 en mama y vesícula biliar. De los pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma 43 (66.2%) eran hombres y 22 (33.8%) eran mujeres. La mediana de edad fue de 67.43 años +/- 9.37 años con un rango de 39 a 89 años de edad. 20 (30.7%) pacientes presentaban tumores de menos de 5 cm al diagnóstico y 34 (52.3%) pacientes tumores mayores de 5 cm. Se clasificaron de acuerdo con Barcelona, 16 (24.6%) pacientes eran Barcelona A al diagnóstico, 11 (16.9%) pacientes Barcelona B, 13 (20%) pacientes Barcelona C y 14 (21.5%) pacientes Barcelona D, 11 (16.9%) pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma no tenían información para completar clasificación según Barcelona. 47 (71.2%) pacientes tenían antecedente de cirrosis hepática, de los cuales 3 (4.6%) pacientes contaban con antecedente de infección por virus de hepatitis B y 19 (29.2%) infección por virus de hepatitis C. 23 (34.8%) pacientes se encontraban en Child Pugh A, 13 (19.7%) pacientes en Child Pugh B y 12 (18.2%) pacientes en Child Pugh C, 18 pacientes restantes no contaban con información suficiente para clasificarlos. La causa más frecuente de cirrosis fue la infección viral en el 51.1% (24) de los casos, seguido por cirrosis criptogénica 34% (16), hígado graso 10.6% (5), alcohol 2.1% (1) y hepatitis autoinmune 2.1% (1). 4 (6.1%) de los pacientes desarrollaron la enfermedad con antecedente de hígado sano. El promedio de alfa feto proteína al diagnóstico fue de 2731.69 U/ml con un rango de más menos 9000 UI/ml. El seguimiento promedio fue de 9.59 meses con un rango de más menos 15.76 meses (**Tabla 1**).

De acuerdo con la extensión de la enfermedad al diagnóstico, 58 (89.2%) pacientes se diagnosticaron con enfermedad localizada, 8 (12.3%) con enfermedad metastásica al diagnóstico de los cuales 6 (9.2%) contaban con enfermedad ósea y 2 (3%) con enfermedad ganglionar. Recibieron tratamiento local 40 (61%) pacientes, 23 de ellos se desconoce el tratamiento. De acuerdo con el tipo de tratamiento local recibido 10 (25%) pacientes tuvieron hepatectomía, 14 (35%) TACE, 5 (12.5%) ablación por radiofrecuencia, 5 (12.5%) cirugía y TACE, 1 (2.5%) cirugía y ablación por radiofrecuencia y 5 (12.5%) pacientes ablación con TACE. Se manejaron con

tratamiento sistémico 11 (16.9%) pacientes en total, de los cuales 1 (1.5%) recibió quimioterapia, 7 (10.7%) inhibidores tirosino cinasa y 3 (4.6%) recibieron ambos tratamientos (**Tabla 1**).

Se obtuvo material de 48 pacientes con diagnóstico de metástasis de adenocarcinoma de los cuales 30 (62.5%) tenían tumor primario en páncreas, 14 (29.1%) en colon y 4 (8.3%) en otras localizaciones como vía biliar y mama (**Tabla 2**).

### **Expresión de NGAL y MMP9 por inmunohistoquímica**

Se realizó inmunohistoquímica en 61 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma, y 48 pacientes con metástasis de adenocarcinoma por lo que se tuvieron que eliminar 4 pacientes incluidos por falta de material (**Figura 1**). De acuerdo con los resultados de inmunohistoquímica para NGAL en pacientes con hepatocarcinoma, 4 (6.6%) de los pacientes obtuvieron 1+, 50 (82%) 2+ y 7 (11.5%) 3+. De los pacientes con metástasis de adenocarcinoma 13 (27.1%) no expresaban, 25 (52.1%) 1+, 6 (12.5%) 2+ y 4 (8.8%) 3+. De acuerdo con los resultados de inmunohistoquímica para MMP9 en pacientes con hepatocarcinoma 23 (37.7%) pacientes no expresaban, 38 (62.3%) 1+ y ningún paciente obtuvo score 2+ y 3+. En los pacientes con diagnóstico de metástasis de adenocarcinoma, 28 (58.3%) de los pacientes no expresaban, 19 (39.6%) 1+, 1 (2.1%) 2+ y ninguno de los pacientes obtuvo score de 3+ (**Figura 4**). Todos los pacientes con hepatocarcinoma presentaron cierto grado de expresión de NGAL y esta fue mayor comparada con los pacientes con metástasis hepáticas ( $P < 0.001$ ), La expresión de MMP9 también fue significativamente mayor en pacientes con hepatocarcinoma comparado con metástasis hepáticas ( $P = 0.042$ ). (**Figura 5**)

De los pacientes con metástasis hepáticas con tumor primario en colon 6 (42.9%) pacientes obtuvieron score para NGAL de 1+, 4 (28.6%) pacientes score de 2+ y 4 (28.6%) pacientes score de 3+, y de los pacientes con tumor primario en páncreas, 17 (56.7%) obtuvieron un score para NGAL de 1+, 1 (3.3%) paciente score de 2+ y en 12 (40%) pacientes no se expresó NGAL. Para MMP9 los pacientes con tumor primario en colon, 13 (92.9%) obtuvieron un score de 1+, y 1 (7.1%) de los pacientes no expresó, y de los pacientes con tumor primario en páncreas 23 (76.7%) pacientes no expresaron, 6 (20%) pacientes obtuvieron score 1+ y 1 (3.3%) paciente únicamente obtuvo score 2+. La

diferencia en la expresión de NGAL y MMP9 en pacientes con metástasis hepáticas fue estadísticamente significativa de acuerdo con el tumor primario con un valor de P de  $<0.001$ , siendo mayor la expresión de NGAL y MMP9 en paciente con tumores provenientes de colon y menor en pacientes con tumores primarios en páncreas. **(Tabla 3)**

Se determinó si existía relación entre las características clínicas con la expresión de NGAL y MMP9 y encontramos que el único factor relacionado con la expresión de MMP9 fue la infección por virus de hepatitis C ( $P=0.047$ ) y se encontró relación entre la expresión de NGAL y la presencia de cirrosis ( $P=<0.0001$ ), la infección por virus de hepatitis B ( $P=0.020$ ), hepatitis C ( $p=0.001$ ) y la presencia de ECOG 2 a 4 al diagnóstico ( $P=<0.0001$ ). **(Tabla 4)** No se encontró relación significativa entre la expresión de MMP9 y NGAL con el resto de variables clínicas e histopatológicas.

### **Supervivencia global**

La mediana de supervivencia global de los pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma fue de 7.12 meses con un intervalo de 1.8 meses a 12.4 meses. Para los pacientes con hepatocarcinoma y expresión de MMP9 la mediana de supervivencia global fue de 23.73 meses (6-11.8) y de los pacientes sin expresión de 7.38 meses (IC 3.9-10.8,  $P=0.68$ ). Y para los pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma y expresión de NGAL la mediana fue de 23.7 meses para score 1+, 11.5 meses para 2+ y 53.13 meses para 3+ ( $P=0.55$ ). **(Figura 1, 2 y 3)**

### 13. DISCUSIÓN

El hepatocarcinoma es el tumor primario del hígado más frecuente (83%) y la séptima causa de muerte por cáncer en México (1). Es un tumor que se encuentra relacionado con el antecedente de cirrosis y por consiguiente se presenta más frecuentemente en pacientes con el antecedente de infección por virus de hepatitis, el consumo de alcohol, y la presencia de hígado graso, entre otras (2, 6). Actualmente se desconocen los factores que favorecen el desarrollo de esta neoplasia, sin embargo es bien conocido que la lesión al parénquima hepático por forma crónica favorece la liberación de factores de crecimiento y la presencia de mutaciones. Es un tumor altamente vascularizado que por sus características radiográficas se puede diagnosticar por estudios de imagen sin la necesidad de obtener tejido para su estudio histopatológico (5). Solo se cuenta con la medición de alfa feto proteína como marcador tumoral, que ayuda al seguimiento y vigilancia de estos pacientes (6). El tratamiento suele ser complejo ya que, la enfermedad hepática subyacente y la presencia de múltiples comorbilidades al diagnóstico limitan las posibilidades de manejo local y sistémico (11). La supervivencia global en los pacientes con hepatocarcinoma depende estrechamente del estadio según BCLC al diagnóstico con una media de 4.9 meses (9). Los datos obtenidos en este grupo de pacientes muestran una mediana de supervivencia de 7.12 meses con un intervalo de 1.8 meses hasta 12.4 meses, independiente del estadio al diagnóstico.

La enfermedad metastásica a hígado con tumor primario gastrointestinal es especialmente frecuente, se considera que la afinidad por el parénquima hepático se encuentra relacionada con la distribución de la vasculatura así como por la presencia de un microambiente que favorece el desarrollo de la enfermedad metastásica (17). Sin embargo se ha demostrado que las características propias de la lesión metastásica son diferentes comparadas con las del tumor primario, independientemente de su localización, mostrando diferentes patrones de crecimiento, expresión de proteínas y vías de proliferación (28).

Las metaloproteinasas de matriz son proteínas relacionadas con incontables procesos fisiológicos que se han relacionado con la presencia y el desarrollo de múltiples neoplasias, entre las que se incluyen el hepatocarcinoma, así como los tumores de colon y páncreas (21). Existen reportes donde se ha relacionado su

expresión como factor predictivo de progresión así como de invasión portal al diagnóstico (21). En este estudio se determinó que la presencia de MMP9 en pacientes con hepatocarcinoma mostraba una tendencia a una menor supervivencia con una diferencia de 12 meses. De igual forma encontramos que la expresión era mayor en pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma, incluso en etapas tempranas de la enfermedad, comparado con los pacientes con metástasis hepáticas de tumores gastrointestinales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa 62.3% vs 41.7% ( $P=0.042$ ). Entre los pacientes con metástasis hepáticas, aquellos con tumor primario en colon mostraron mayor expresión comparados con los pacientes con tumor primario en páncreas 92.9% vs 23.3% ( $P<0.0001$ ). Estos resultados son similares a los previamente reportados por Illeman en los que se había demostrado que la expresión de MMP9 en lesiones metastásicas era menor comparado con la expresión del tumor primario, probablemente secundario a la presencia de mecanismos proteolíticos diferentes a los del tumor primario que permiten el crecimiento de las células tumorales en el tejido hepático (29). No existen estudios previos que se hayan realizado específicamente en metástasis de tumores pancreáticos que nos permitan comparar los hallazgos obtenidos en este estudio.

La lipocalina de neutrófilo asociada a gelatinasa es una proteína transportadora que se ha relacionado con procesos de diferenciación y proliferación. Se ha estudiado la relación entre NGAL y MMP9 y se demostró que pudieran estar involucrados con el desarrollo de múltiples neoplasias, entre ellas diversos tumores gastrointestinales. Investigaciones previas han permitido determinar que su expresión se asocia con factores de mal pronóstico al diagnóstico y con una disminución en la supervivencia global (2, 30). De acuerdo con los resultados obtenidos, la expresión de NGAL pareciera tener una tendencia a una menor supervivencia global comparada con los pacientes que no sobre expresan ( $P=0.55$ ), sin embargo no se encontró relación entre la expresión con factores de mal pronóstico al diagnóstico como mayor tamaño tumoral y un estadio BCLC avanzado al diagnóstico. Pareciera que la presencia de cirrosis ( $P<0.0001$ ), y la infección por virus de hepatitis ( $P=0.020$  para VHB y  $P=0.001$  para VHC) y un peor estado funcional al diagnóstico ( $P<0.0001$ ) si son factores que se encuentran relacionados con una mayor expresión. Previamente, en el estudio de Zhang, se había demostrado esta asociación entre la expresión de NGAL y cirrosis, sin embargo, contrario a sus resultados, no se encontró relación entre la expresión y un estadio avanzado al diagnóstico.

De igual forma la expresión de NGAL en pacientes con hepatocarcinoma fue significativamente mayor que en pacientes con metástasis hepáticas 100% vs 72.9 (P=<0.0001). Y la expresión en pacientes con tumor primario en colon fue significativamente mayor que en pacientes con tumor primario en páncreas 100% vs 60% (P=<0.0001). Similar al estudio previo de Candido parece ser que la expresión de NGAL es menor en las lesiones metastásicas comparadas con el tumor primario (35). Y en el estudio de Tong, se demostró que la expresión de NGAL en pacientes con tumores pancreáticos moderadamente o pobremente diferenciados era prácticamente nula comparativamente con tumores tempranos bien diferenciados donde la expresión era alta, se relacionó además, la sobre expresión con inhibición de la adhesión e invasión en pacientes con tumores pancreáticos, pudiendo ser la “perdida” de expresión un marcador temprano de enfermedad metastásica (45).

Sin embargo, no existen estudios previos que hayan comparado la expresión de estas proteínas en hepatocarcinoma vs lesiones metastásicas; Es importante recalcar que la totalidad de los pacientes con hepatocarcinoma, aun en estadios tempranos, presentaron cierto grado de expresión lo cual pudiera dar base a estudios más amplios que exploren el su valor como marcadores tempranos así como blancos terapéuticos que permitan evitar la progresión a estadios más avanzados.

Los estudios sobre la expresión de NGAL han tenido resultados heterogéneos, lo que pudiera significar que dependiendo de las características tumorales pudiera resultar en un mejor o peor pronóstico por lo que es necesario complementar los resultados obtenidos para poder determinar en qué tipo de neoplasias pudiera actuar como marcador de buen o mal pronóstico e incluso como potencial blanco terapéutico.

## 14. CONCLUSIONES

En este grupo de pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma la expresión de MMP9 y NGAL fue mayor que en las muestras de pacientes con metástasis hepáticas. A su vez, de los pacientes con metástasis hepáticas con tumor primario en colon, se encontró una mayor expresión comparados con los pacientes con tumor primario en páncreas. La diferencia en supervivencia global entre el grupo que expresa y el que no expresa no fue estadísticamente significativo sin embargo existe una tendencia, aún más notoria para la expresión de MMP9. Los únicos factores clínicos aparentemente relacionados con la expresión de NGAL es la presencia de cirrosis, la infección por virus de hepatitis B y C y el estado funcional (ECOG). Es necesaria la validación de estos marcadores en un grupo más numeroso de pacientes que permita determinar con mayor claridad su papel como factor pronóstico en pacientes con neoplasias primarias o metastásicas en hígado.

## TABLAS Y FIGURAS

| <b>Tabla 1. Características basales de la población con hepatocarcinoma</b> |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|
| <b>Características</b>  | <b>Total (N=65)</b>      | <b>Porcentaje (100%)</b> |
| <b>SEXO</b>   |                          |                          |
| Femenino  | 22                       | 33.8%                    |
| Masculino   | 43                       | 66.2%                    |
| <b>EDAD</b>   |                          |                          |
| Media   | 67.43 años +/- 9.37 años |                          |
| Rango   | 39 a 89 años             |                          |
| <b>TAMAÑO</b>   |                          |                          |
| Menor de 5 cm   | 20                       | 30.7%                    |
| Mayor de 5 cm   | 34                       | 52.3%                    |
| Desconoce   | 11                       | 16.9%                    |
| <b>METASTASIS</b>   |                          |                          |
| Si  | 8                        | 12.3%                    |
| Hueso   | 6                        | 9.2%                     |
| Ganglionar  | 2                        | 3%                       |
| No  | 57                       | 87.6%                    |
| <b>BCLC</b>   |                          |                          |
| A   | 16                       | 24.6%                    |
| B   | 11                       | 16.9%                    |
| C   | 13                       | 20%                      |
| D   | 14                       | 21.5%                    |
| Desconoce   | 11                       | 16.9%                    |
| <b>Cirrosis</b>   |                          |                          |
| Si  | 47                       | 71.2%                    |
| Hígado sano   | 4                        | 6.1%                     |
| Desconoce   | 14                       | 21.5%                    |
| <b>Child Pugh</b>   |                          |                          |
| A   | 23                       | 34.8%                    |
| B   | 13                       | 19.7%                    |
| C   | 12                       | 18.2%                    |
| Desconoce   | 17                       | 26.1%                    |
| <b>Causas de cirrosis</b>   |                          |                          |
| Alcohol   | 1                        | 2.1%                     |
| Viral   | 24                       | 51.1%                    |
| Criptogenica  | 16                       | 34%                      |
| Hígado graso  | 5                        | 10.6%                    |
| Autoinmune  | 1                        | 2.1%                     |
| <b>Infección por virus hepatitis</b>  |                          |                          |
| VHB   | 3                        | 4.6%                     |
| VHC   | 19                       | 29.2%                    |
| <b>TRATAMIENTO</b>  |                          |                          |
| Local   | 40                       | 61%                      |
| <b>Tipo de tratamiento local</b>  |                          |                          |
| Cirugía   | 10                       | 25%                      |
| TACE  | 14                       | 35%                      |
| Ablación por radiofrecuencia  | 5                        | 12.5%                    |
| Cirugía + TACE  | 5                        | 12.5%                    |
| Cirugía + ablación  | 1                        | 2.5%                     |

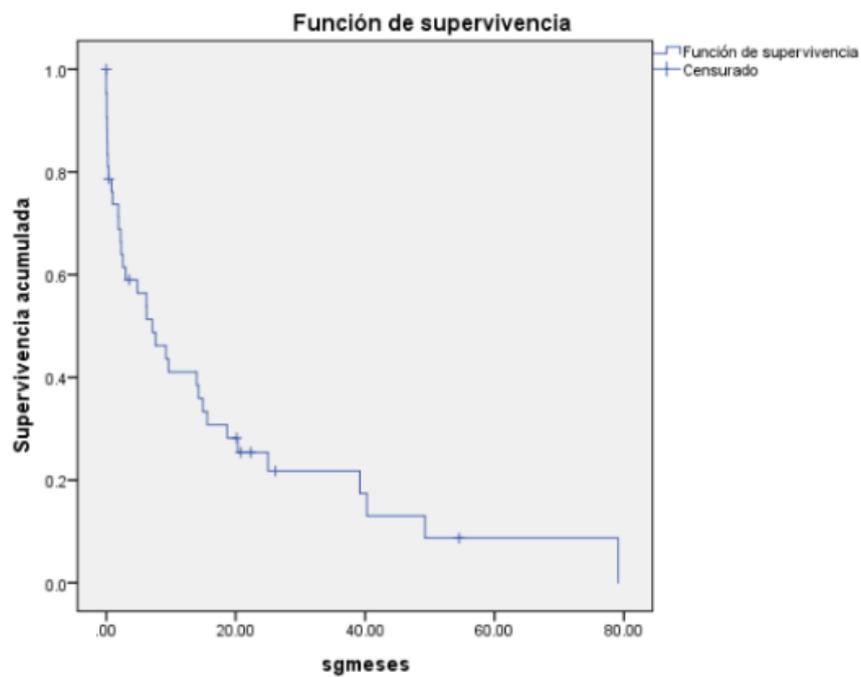
|   |                            |       |
|---|----------------------------|-------|
| TACE + Ablación   | 5                          | 12.5% |
| Sistémico   | 11                         | 16.9% |
| Quimioterapia   | 1                          | 1.5%  |
| Inhibidores tirosino cinasa   | 7                          | 10.7% |
| Ambos   | 3                          | 4.6%  |
| Alfa feto proteína  |                            |       |
| Media   | 2731.69 +/- 9000 U/ml      |       |
| Rango   | 1.3 a 53 193               |       |
| Seguimiento, meses (promedio)   | 9.59 meses +/- 15.76 meses |       |
| ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, VHB: Virus Hepatitis B, VHC: Virus Hepatitis C, BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer, MMP9: Metaloproteinasa de matriz 9, NGAL: Lipocalina de neutrófilo asociado a gelatinasa, TACE: Quimioembolización arterial transcaterter |                            |       |

| Tumor primario | Total (N=48) | Porcentaje (100%) |
|----------------|--------------|-------------------|
| Páncreas       | 30           | 62.5%             |
| Colon          | 14           | 29.1%             |
| Otros          | 4            | 8.3%              |

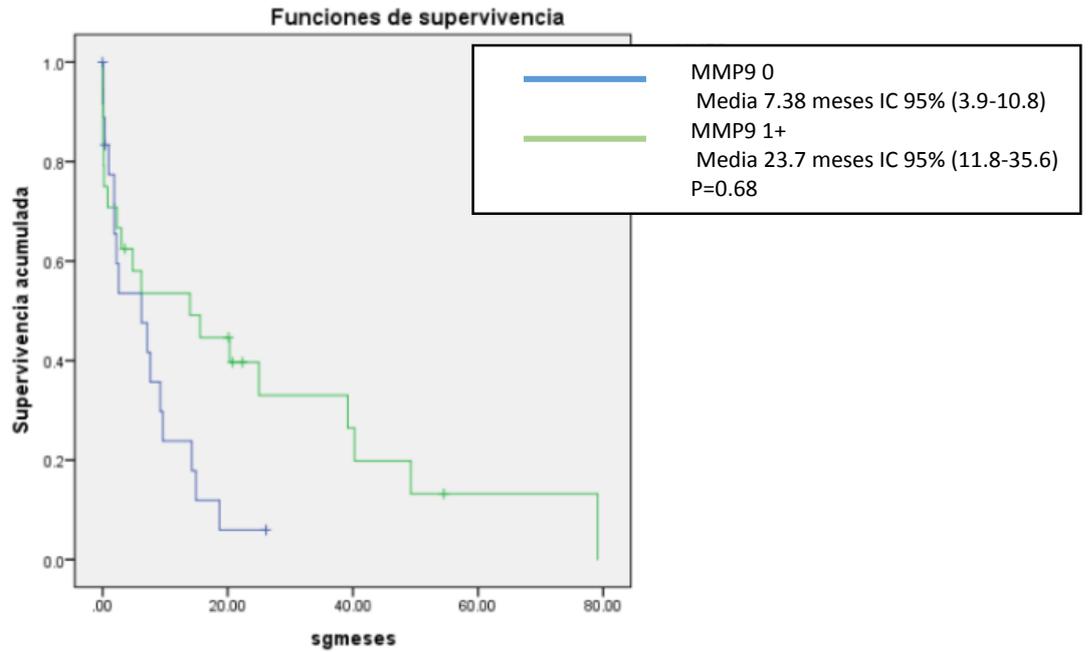
|                   | 0          | 1          | 2         | 3         | Valor P   |
|-------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>NGAL</b>       |            |            |           |           |           |
| Primario colon    | 0          | 6 (42.9%)  | 4 (28.6%) | 4 (28.6%) | P=<0.0001 |
| Primario páncreas | 12 (40%)   | 17 (56.7%) | 1 (3.3%)  | 0         |           |
| Otros             | 1 (25%)    | 2 (50%)    | 1 (25%)   | 0         |           |
| <b>MMP9</b>       |            |            |           |           |           |
| Primario colon    | 1 (7.1%)   | 13 (92.9%) | 0         | 0         | P=<0.0001 |
| Primario páncreas | 23 (76.7%) | 6 (20%)    | 1 (3.3%)  | 0         |           |
| Otros             | 4 (100%)   | 0          | 0         | 0         |           |

|                            | MMP9   | NGAL      |
|----------------------------|--------|-----------|
| <b>BCLC</b>                |        |           |
| Estadios tempranos (A y B) | P=0.45 | P=0.33    |
| Estadios avanzados (C y D) |        |           |
| <b>Cirrosis</b>            |        |           |
| Si                         | P=0.65 | P=<0.0001 |

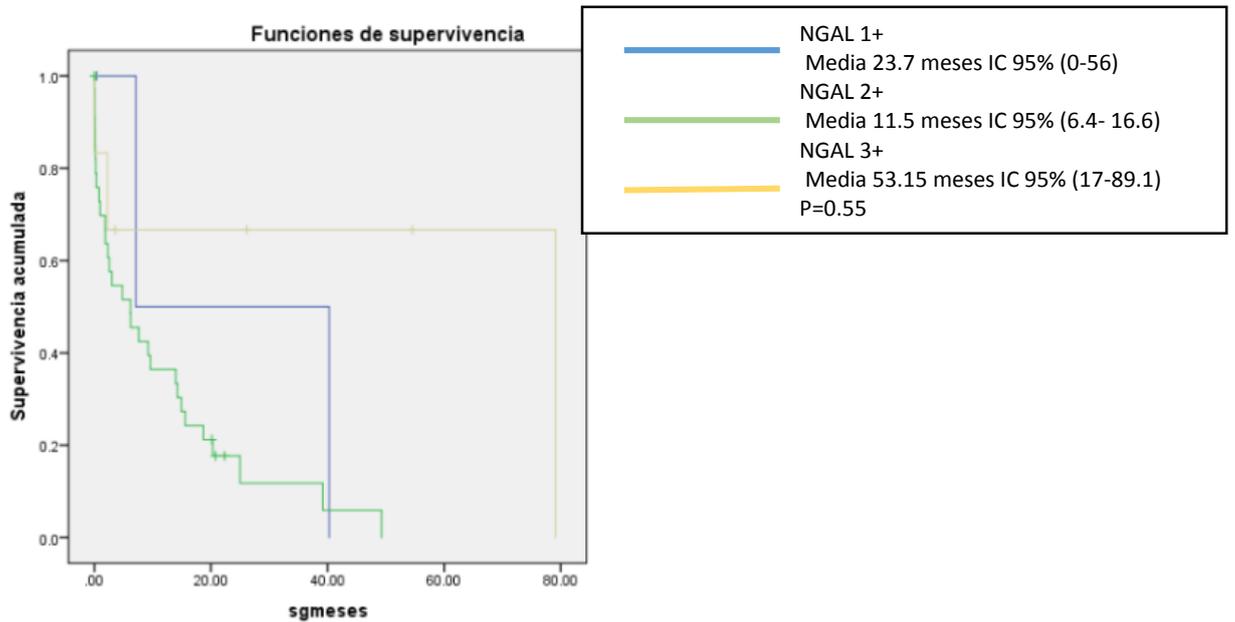
|   |         |           |
|---|---------|-----------|
| No  |         |           |
| <b>Infección por virus hepatitis</b>  |         |           |
| VHB   | P=0.072 | P=0.020   |
| VHC   | P=0.047 | P=0.001   |
| <b>ECOG al diagnóstico</b>  |         |           |
| 0-1   | P=0.43  | P=<0.0001 |
| 2-4   |         |           |
| <b>Tamaño al diagnóstico</b>  |         |           |
| Menor 5 cm  | P=0.64  | P=0.28    |
| Mayor 5 cm  |         |           |
| <small>ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, VHB: Virus Hepatitis B, VHC: Virus Hepatitis C, BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer, MMP9: Metaloproteínasa de matriz 9, NGAL: Lipocalina de neutrófilo asociado a gelatinasa</small> |         |           |



**Figura 1. Kaplan Meier para Supervivencia global para pacientes con diagnóstico de hepatocarcinoma con una media de 17.6 meses**



**Figura 2. Kaplan Meier para Supervivencia en pacientes sin expresión de MMP9 y pacientes con expresión MMP9 1+**



**Figura 3. Kaplan Meier para Supervivencia en pacientes con expresión NGAL 1+, 2+ y 3+**

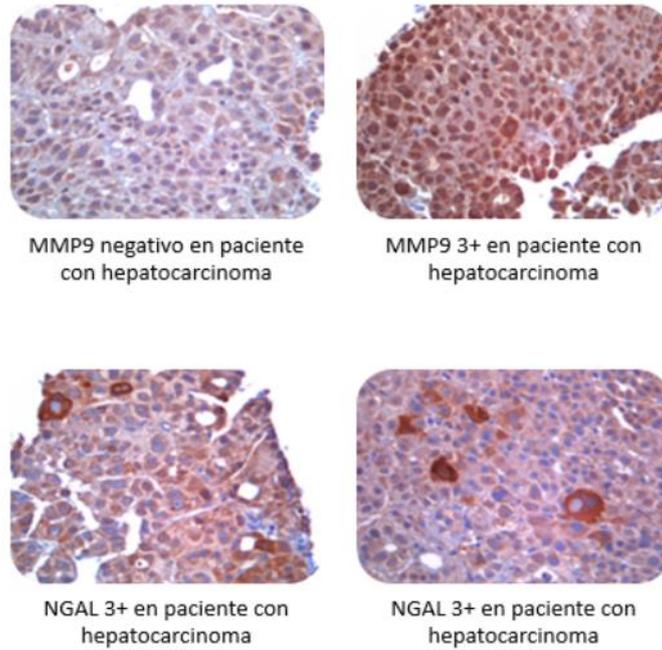
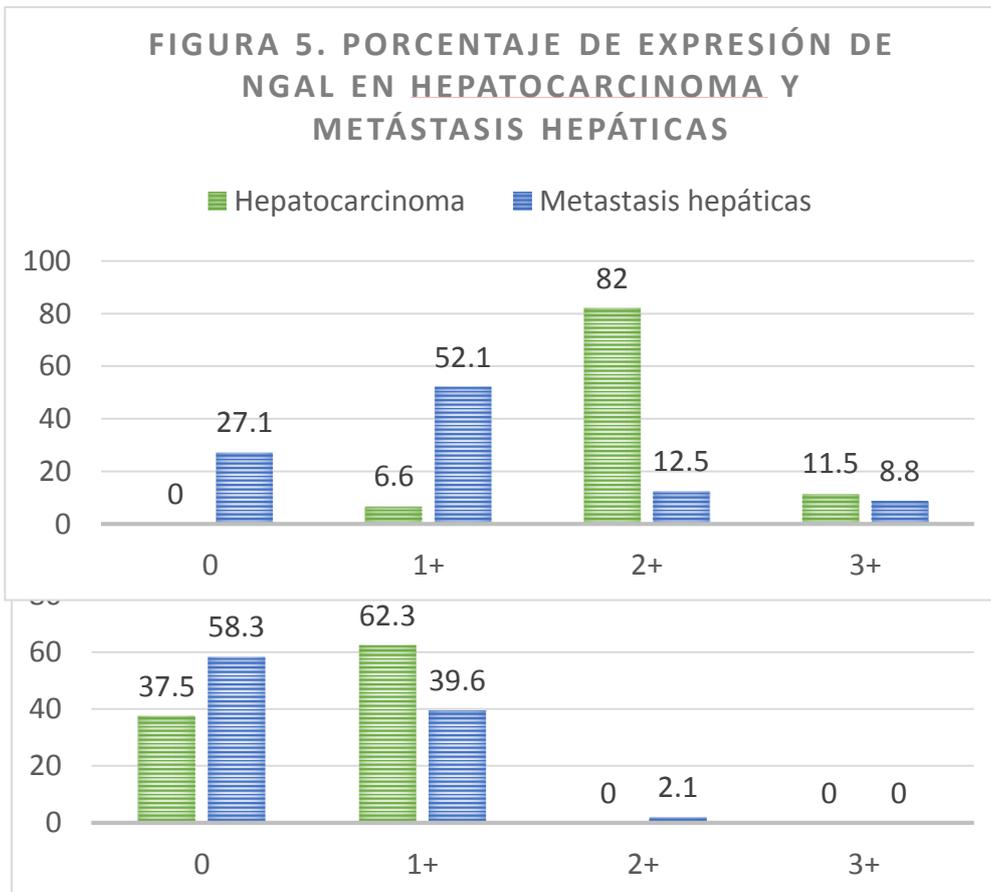
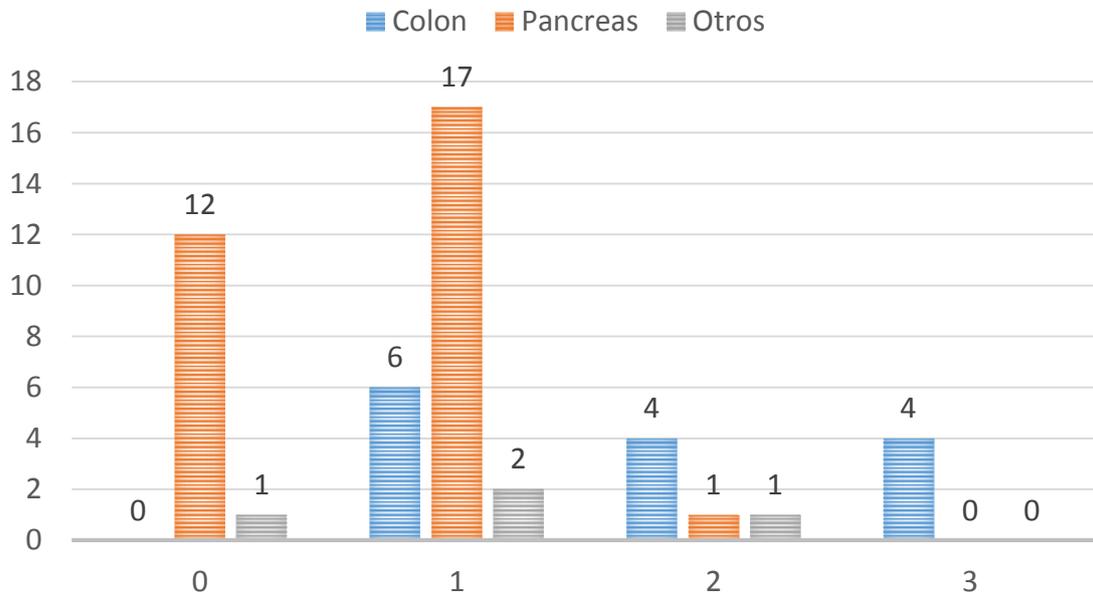


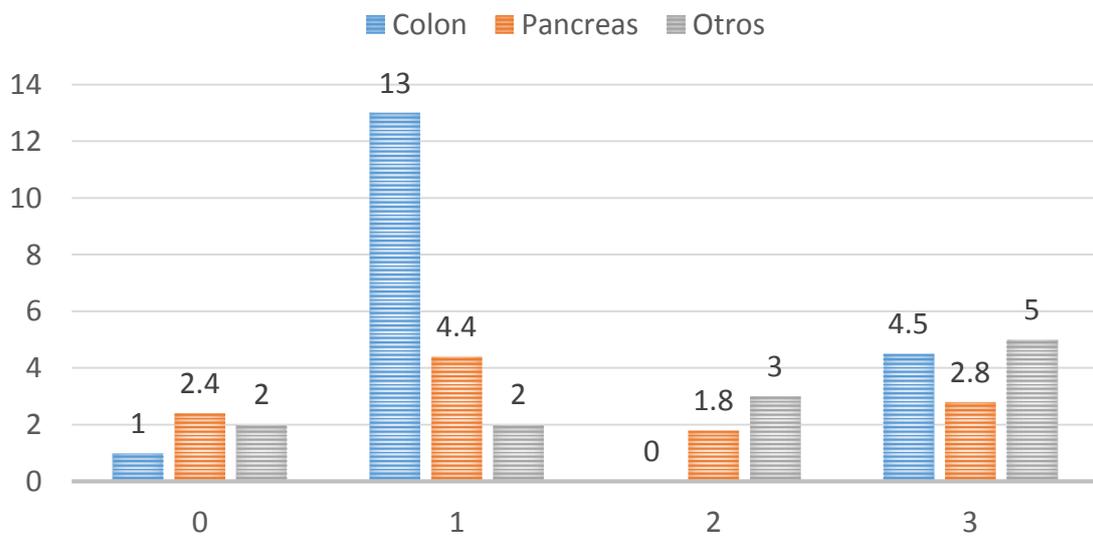
Figura 4. Inmunohistoquímica para MMP9 y NGAL en paciente con hepatocarcinoma.



**FIGURA 7. EXPRESIÓN DE NGAL EN METASTASIS HEPATICAS SEGÚN TUMOR PRIMARIO**



**FIGURA 8. EXPRESIÓN DE MMP9 EN METÁSTASIS HEPÁTICAS SEGÚN TUMOR PRIMARIO**



## 15. BIBLIOGRAFÍA

1. Mahmoud Fathy Dondeti, Eman Anwar El-Maadawy, Roba Mohamed Talaat. Hepatitis-related hepatocellular carcinoma: Insights into cytokine gene polymorphisms. *World J Gastroenterol* 2016 August 14; 22(30): 6800-6816
2. Y. Zhang et al. NGAL and NGALR overexpression in human hepatocellular carcinoma toward a molecular prognostic classification. *Cancer Epidemiology* 36 (2012) e294–e299
3. Martin Granados, Oscar Gerardo Arrieta, Jose Hinojosa. “Tratamiento del cancer. Oncología medica, quirurgica y radioterapia”. Manual Moderno.
4. Xin-Lei Gong, Shu-Kui Qin. Progress in systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016 August 7; 22(29): 6582-6594
5. Jörg Trojan. “Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments”. *Visc Med* 2016;32:116–120
6. Vincent De vita, Theodore Lawrence, Steven Rosenberg. “Cancer. Principle and practice of oncology” 10 edition. Wolters Kluwer. 2015.
7. Yan-Jie Zhao, Qiang Ju. “Tumor markers for hepatocellular carcinoma”. *Molecular and clinical oncology*. 2013; 1, 593- 598.
8. Eldad Bialecki, Adrian Bisceglie. “Diagnosis of hepatocellular carcinoma”. *HPB*, 2005; 7, 29- 34
9. Duseja Ajay, Staging of hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2014; 4, S74- S79.
10. Tuck Leong Yong, Nesor Houli and Chris Christophi. “Anatomy of hepatic lymphatics and its implications in hepatic malignancies”. *ANZ J Surg*; 2016
11. Vivek A. Saraswat, Gaurav Pandey, Sachin Shetty. Treatment Algorithms for Managing Hepatocellular Carcinoma. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 2014;4:S80–S89.
12. Martin Granados, Oscar Gerardo Arrieta, Jose Hinojosa. “Tratamiento del cancer. Oncología medica, quirurgica y radioterapia”. Manual Moderno.
13. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R et al. “ Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis”. *New England Journal of Medicine*. 1996. 334. 693-698

14. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma". *New England Journal of Medicine*. 2008; 359: 378-390.
15. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. "Efficacy and safety of sorafenib in patients in th Asia- Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: A phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncology*. 2009;10(1): 25-34
16. Brodt, Pnina. "Role of the microenvironment in liver metastasis: from pre- to pro-metastatic niches". The Research Institute of the McGill University Health Centre
17. Olga Golubnitschaja, Krishna Chander Sridhar. Liver metastatic disease: new concepts and biomarker panels to improve individual outcomes. *Clin Exp Metastasis*. Agosto 2016.
18. Gert Van den Eynden, Ali Majeed, Martin Illemann, et al. "The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: Biology and Clinical Implications". *Cancer Res* 2013; 73(7); 2031–43.
19. Luai R. Zarour, Sudarshan Anand, Kevin G. Billingsley, "Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving paradigms and future directions". *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;3:163–173.
20. Marcus Tan, William Jarnagin. "Surgical Management of non-colorectal hepatic metastasis". *Journal of Surgical Oncology* 2014;109:8–13
21. Chen Xian, Bo Lianhua, Zhao Xue, Chen Qi. MicroRNA-133a inhibits cell proliferation, colony formation ability, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 9 in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 11. (2015). 3900-3907.
22. Yu-Jen Wu, Choo-Aun Neoh, Chia-Yu Tsao. Sinulariolide Suppresses Human Hepatocellular Carcinoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2/-9 through MAPKs and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16, 16469-16482.
23. Sergio Duarte, John Baber, Takehiro Fujii and Ana J. Coito. "Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis". *Matrix Biology*. 2015.
24. Shaoshan Han, Lei Han, Yingmin Yao. Activated hepatic stellate cells promote hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via the activation of FAK-MMP9 signaling. *Oncology Reports*. 2014. 31: 641-648.
25. Qingquan Liu, Pinghua Yang, Kangsheng Tu. TPX2 knockdown suppressed hepatocellular carcinoma cell invasion via inactivating AKT signaling and

- inhibiting MMP2 and MMP9 expression. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2014, 26; 410-417.
26. Cheng -yun Dou, Chuang -jie Cao, Zhuo Wang. EFEMP1 inhibits migration of hepatocellular carcinoma by regulating MMP2 and MMP9 via ERK1/2 activity. *Oncology Reports* 2016, 35: 3489-3495.
27. Jie Gao, Feihu Ding, Qingguang Liu. Knockdown of MACC1 expression suppressed hepatocellular carcinoma cell migration and invasion and inhibited expression of MMP2 and MMP9. *Mol Cell Biochem*. 2013; 376:21–32
28. Zeng, ZS, Guillem, JG. “Unique activation of matrix metalloproteinase-9 within human liver metastasis from colorectal cancer”. *British Journal of Cancer* 1998) 78(43). 349-353
29. Martin Illemann, Nigel Bird, Ali Majeed. “MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases”. *Mol Cancer Res* 2006;4(5):293–302
30. Davide Bolignano, Valentina Donato, Antonio Lacquaniti, Maria Rosaria Fazio, Caterina Bono, Giuseppe Coppolino, Michele Buemi. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: A new protein enters the scene. *Cancer Letters* 288 (2010) 10–16
31. S.P. Stoesz, A. Friedl, J.D. Haag, M.J. Lindstrom, G.M. Clark, M.N. Gould, Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers, *Int. J. Cancer* 79 (1998) 565–572.
32. W.K. Fang, L.Y. Xu, X.F. Lu, L.D. Liao, W.J. Cai, Z.Y. Shen, et al., A novel alternative spliced variant of neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor in oesophageal carcinoma cells, *Biochem. J.* 403 (2007) 297–303.
33. Ze-Peng Du, Zhuo Lv, Bing-Li Wu. “Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and its receptor: independent prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma”. *J Clin Pathol* 2011;64:69e74.
34. Barresi V, Tuccari G, Barresi G. “NGAL immunohistochemical expression in brain primary and metastatic tumors”. *Clin Neuropathol*. 2010. 29 (5): 317-322.
35. Saverio Candido, Roberta Maestro, Jerry Polesel. “Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer”. *Oncotarget*. 2013. 5(6): 1576-1594.

36. Jonathan R. Cogley, Frank H. Miller. "MR Imaging of benign focal liver lesions". *Radiol Clin N Am*. 2014
37. Agustin Cristiano, Agustin Dietrich, et al. "Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: current diagnosis and management". *Updates Surgery*. 2013
38. Daniel J Szor, Mauricio Ursoline. "Hepatic adenoma". *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2013;26(3):219-222
39. Ramit Lamba, Ghaneh, Fananazapir, et al. "Diagnostic imaging of hepatic lesions in adults". *Surg Oncol Clin N Am* 23 (2014) 789–820
40. Takamichi Murakami, Masakatsu Tsurusaki. Hypervascular Benign and Malignant Liver Tumors That Require Differentiation from Hepatocellular Carcinoma: Key Points of Imaging Diagnosis. *Liver Cancer* 2014;3:85–96
41. Oscar Arrieta, Bernardo Cacho, Daniela Morales-Espinosa, et al. "The progressive elevation of alpha fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis". *BMC Cancer*. 2007; 7, 28.
42. Yoshiaki Sato, Keisuke Nakata, Yuji Kato et al. "Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein", *The New England Journal of Medicine*. 1993; 328, 1802-1806.
43. Mohini Patil, Mei-Sze Chua, Kuang-Hung Pan. "An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma". *Oncogene* (2005) 24, 3737–3747. PMID: 15735714
44. Ruiz Morales Jose Manuel, Dorantes Heredia Rita, Arrieta Oscar, Chávez Tapia Norberto, Motola Daniel. "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) prognostic value in lung adenocarcinoma". *Tumour Biology*. 2015; 36(5): 3601-10. PMID:25542236
45. Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, Matsuo Y, Diagaradjane P, Harikumar KB, et al. "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel supresor of invasión and angiogénesis in pancreatic cáncer". *Cancer research*. 2008;68(15): 6100-6108.

