Tesi Doctoral

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

INTERACCCIÓ LEUCÒCIT-ENDOTELI I MOBILITZACIÓ DE CÈL·LULES NEOPLÀSTIQUES EN EL CÀNCER COLORECTAL

Tesi presentada per Xavier Bessa i Caserras per optar al grau de Doctor en Medicina

Directors: Josep M. Piqué i Badia

Antoni Castells i Garangou

Barcelona, 2002

D. JOSEP MARIA PIQUÉ I BADIA, PROFESSOR ASSOCIAT DE MEDICINA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA I CAP DE SERVEI DE GASTROENTEROLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que la memòria que duu per títol "Interacció leucòcit-endoteli i mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el càncer colorectal", presentada per Xavier Besa i Caserras per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia ha estat realitzada sota la meva direcció. Havent-la considerada finalitzada, n'autoritzo la presentació per a ésser jutjada pel tribunal escaient.

I per a que així en quedi constància als efectes oportuns, signo la present a Barcelona, el 1 de novembre del 2002.

Dr. Josep M. Piqué i Badia

Professor Associat de Medicina

D. ANTONI CASTELLS I GARANGOU, METGE ESPECIALISTA SÈNIOR DEL SERVEI DE GASTROENTEROLOGIA DE L'HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que la memòria que duu per títol "Interacció leucòcit-endoteli i mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el càncer colorectal", presentada per Xavier Besa i Caserras per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia ha estat realitzada sota la meva direcció. Havent-la considerada finalitzada, n'autoritzo la presentació per a ésser jutjada pel tribunal escaient.

I per a que així en quedi constància als efectes oportuns, signo la present a Barcelona, el 1 de novembre del 2002.

Dr. Antoni Castells i Garangou

Metge Especialista Sènior

DEDICAT A:

En Joan, en Lluís i la Llúcia

PRESENTACIÓ

La present Tesi Doctoral s'estructura, seguint les directrius de la normativa per a la presentació de tesis doctorals, com un compendi de publicacions, aprovada pel consell del Departament de Medicina de la Universitat de Barcelona el 17 de Maig de 1997.

Els estudis que conformen aquesta Tesi Doctoral pertanyen a una mateixa línia de investigació, destinada a caracteritzar els fenòmens de progressió i disseminació tumoral en el càncer colorectal. Els resultats d'aquests estudis han aportat informació rellevant i novedosa en aquest camp, i han estat recollits en cinc articles originals publicats a revistes d'àmplia difusió internacional amb un índex d'impacte global de 38,81

AGRAÏMENTS

Ja dic per endavant que això d'escriure agraïments sempre se m'ha donat molt malament, però tots els que em coneixeu sabeu que us estic molt agraït a tots.

A en Toni Castells, ha estat un plaer aprendre dels seus coneixements i sobretot de la seva manera de ser. Ha estat i és un estímul per a continuar aprenent. La única llàstima es no haver pogut compartir mes temps treballant plegats.

A en Ignasi Elizalde, per haver-me aguantat les meves neures i defectes en el període de la tesi. Espero que el seu magnífic bolígraf vermell pugui castigar durant molts anys als becaris que cauran a les seves mans.

A la Loreto Boix, la persona que em va ensenyar tot el que jo se de biologia molecular. Treballar amb ella es lo més senzill del mon.

A la Virgínia Pinyol, la que mana a la unitat, per el seu suport durant el poc temps en que malauradament vàrem compartir al laboratori.

A en Sergi Castellví, el desmitificador de la biologia molecular. Una autentica llàstima no haver pogut compartir més temps en el laboratori per aprendre de la gran quantitat de coneixements que té.

A en Antonio Soriano, per el magnífic suport que em va donar per poder ajudar a finalitzar tots els experiments de la tesi. Sense ell hauria estat molt més difícil fer les coses.

A tota la resta de becaris del Servei, en Micky Sans, l'Azucena Salas, la Meritxell Gironella, la Meritxell Molla.

A en Josep Maria Piqué, un exemple de Cap de Servei, una persona amb una racionalitat, capacitat de treball i de investigació francament envejable. En tot moment no ha faltat el seu suport i la seva visió crítica en l'execució de la Tesi.

A en Julià Panés, per tot el suport científic durant l'execució de la Tesi. Es admirable la capacitat d'encoratjar als becaris per continuar la recerca i la fascinació que provoca explicar-li algun "experiment addicional".

A en Salvador Navarro, la seva qualitat humana ha de ser un mirall per tothom.

A en Faust Feu, exemple de dedicació a la feina mèdica. No te mai horari quan es tracta d'atendre els malalts.

A la Maite Gueto, espero que ara que no l'emprenyo" en excés em trobi a faltar una míqueta.

A tots els companys residents del Hospital Clínic, en especial al meu company de promoció, l'Albert Sanchez.

A les persones del Hospital del Mar, que van fer molt més agradable la redacció de la Tesi. Sense el seu suport i companyia això hauria estat molt més dur, van aconseguir que fos tremendament divertit escriure la Tesi.

A la meva família

BEQUES

Els treballs que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat efectuats amb el suport dels següents ajuts personals a la recerca:

- Premi Final de Residència de l'Hospital Clínic de Barcelona, durant els anys 1999-2000, pel projecte "Interacció leucòcit–endoteli i mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el càncer colorectal".

- Beca de Formació Personal Investigador de l'Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS) durant els anys 2001-2002, pel projecte "Interacció leucòcit–endoteli i mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el càncer colorectal".

CONGRESSOS

Els resultats dels estudis que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat presentats en els congressos que es relacionen a continuació:

- Castells A, Bessa X, Boix L, Gargallo L, Piqué JM.
  Detección de células colónicas circulantes en pacientes con cáncer colorrectal.
  I Reunión Nacional de Gastroenterología. Madrid, 3 i 4 de desembre de 1997

- Bessa X, Elizalde JI, Castells A, Mitjans F, Salas A, Soriano A, Panés J, Piulats J, Piqué JM.
  Reclutamiento leucocitario en el cáncer colorrectal experimental.
  II Reunión Nacional de Gastroenterología. Madrid, 11 i 12 de desembre de 1998.

- Bessa X, Elizalde JI, Castells A, Mitjans F, Salas A, Soriano A, Panés J, Piulats J, Piqué JM.
  Reclutament leucocitari en el càncer colorectal experimental.
  VIII Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Palma de Mallorca, 29-31 de gener de 1999.

- Bessa X, Elizalde JI, Castells A, Mitjans F, Salas A, Soriano A, Panés J, Piulats J, Piqué JM.
  Reclutamiento leucocitario en el cáncer colorrectal experimental.
  VIII Congreso de la Asociación Española de Investigación sobre el Cancer. Sitges 19-20 d'abril de 1999.

- Bessa X, Elizalde JI, Castells A, Mitjans F, Salas A, Soriano A, Panés J, Piulats J, Piqué JM.

  Leukocyte recruitment in an experimental model of colorectal cancer.

  100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. Orlando 16-19 de maig de 1999.

- Bessa X, Elizalde JI, Piñol V, Castells A, Mitjans F, Soriano A, Mollà M, Panés J, Piulats J, Piqué JM.

  Influencia de mediadores tumorales sobre el reclutamiento leucocitario en un modelo de cáncer colorrectal.

  III Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterologia. Madrid, 10-11 de desembre de 1999.

- Bessa X, Castells A, Lacy AM, Boix L, Elizalde JI, Gargallo L, Piñol V, Piqué JM.

  La cirugía como factor favorecedor de la diseminación tumoral en el cáncer colorrectal.

  III Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid, 10-11 de desembre de 1999.

- Bessa X, Elizalde JI, Piñol V, Castells A, Mitjans F, Soriano A, Mollà A, Panés J, Piulats J, Piqué JM.

  Influència de mediadors tumorals en un model de càncer colorectal.

  IX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Tortosa, 27-29 de gener del 2000.

- Bessa X, Castells A, Lacy AM, Boix L, Elizalde JI, Gargallo L, Piñol V, Piqué JM. ¿Pot la cirurgia per via laparoscòpica afavorir la disseminació del càncer colorectal?.

  IX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Tortosa, 27-29 de gener del 2000.

- Bessa X, Castells A, Lacy AM, Boix L, Elizalde JI, Gargallo L, Piñol V, Piqué JM. Can laparoscopic surgery enhance colorectal cancer spread?.

  101nd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. San Diego, 21-24 de maig del 2000.

- Bessa X, Castells A, Mitjans F, Elizalde JI, Panés J, Piñol V, Piulats J, Piqué JM. TGF-β determines leukocyte-endothelial cell interactions in experimental colorectal cancer.

  101nd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. San Diego, 21-24 de maig del 2000.

- Bessa X, Elizalde JI, Piñol V, Lacy AM, Saló J, Piqué JM, Castells A.

  Valor pronòstic de la presència de cèl·lules neoplàstiques en pacients amb càncer colorectal.

  X congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Lloret de Mar, 1-3 de febrer del 2001.

- Bessa X, Elizalde JI, Piñol V, Lacy AM, Saló J, Piqué JM, Castells A.

  Implicación pronóstica de la detección en sangre periférica de células neoplásicas circulantes. Estudio prospectivo en pacientes con cáncer colorrectal.

  IV Congreso de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid, 2 i 3 de març del 2001.

- Bessa X, Piñol V, Castellvi-Bel S, Pellise M, Piazuelo E, Lacy AM, Elizalde JI, Piqué JM, Castells A.

  Valor pronòstic de la detecció postoperatòria de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb càncer colorectal.

  XI Congrés de la Societat Catalana de Digestologia. Reus, 31 de gener i 1-2 de febrer del 2002.

- Bessa X, Piñol V, Castellvi-Bel S, Pellise M, Piazuelo E, Lacy AM, Elizalde JI, Piqué JM, Castells A.

  Valor pronóstico de la detección postoperatoria de células neoplásicas circulantes en pacientes con cáncer colorrectal.

  V Congreso de la Asociación Española de Gastroenterología. Madrid, 1 i 2 de març del 2002.

ÍNDEX

1. Articles inclosos 20

2. Justificació de la Tesi 22

3. Introducció 30

3.1. Epidemiologia i mecanismes moleculars del càncer colorectal 30

3.1.1. Càncer colorectal esporàdic 31

3.1.2. Poliposi adenomatosa familiar 34

3.1.3. Càncer colorectal hereditari no lligat a poliposi 38

3.2. Invasió i metàstasis en el càncer colorectal 43

3.3. Tractament del càncer colorectal 46

3.3.1. Tractament del tumor primari 46

3.3.2. Tractament complementari 48

3.4. Pronòstic del càncer colorectal 50

3.5. Paper del reclutament leucocitari en el càncer colorectal 54

3.5.1. Mecanismes moleculars de la interacció leucòcit-endoteli 56

3.5.2. Interacció leucòcit-endoteli en el càncer colorectal experimental 59

3.5.3. Quantificació de l'expressió de molècules d'adhesió endotelial 60

3.5.4. Participació dels productes derivats del tumor en els fenòmens de reclutament leucocitari 62

3.6. Detecció i importància clínica de la malaltia mínima residual 70

4. Publicacions originals 76

5. Discussió 78

6. Conclusions 88

7. Bibliografia 92

ARTICLES INCLOSOS

Els resultats dels estudis que constitueixen la base de la present Tesi Doctoral han estat recollits en les següents publicacions:

1. Leukocyte recruitment in colon cancer: Role of cell adhesion molecules, nitric oxide and transforming growth factor β1

   Bessa X, Elizalde JI, Mitjans F, Piñol V, Miquel R, Panés J, Piulats J, Piqué JM, Castells A.

   Gastroenterology 2002; 122: 1122-1132.

2. Detecction of colonic cells in peripheral blood of colorectal patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction.

   Castells A, Boix L, Bessa X, Gargallo L, Piqué JM.

   British Journal of Cancer 1998; 78: 1368-1372.

3. Laparoscopic-assisted vs. open colectomy for colorectal cancer: Influence on neoplastic cell mobilization.

   Bessa X, Castells A, Lacy AM, Elizalde JI, Delgado S, Boix L, Piñol V, Pellisé M, García-Valdecasas JC, Piqué JM.

   Journal of Gastrointestinal Surgery 2001; 5: 66-73.

4. Lack of prognostic significance of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer.

   Bessa X, Elizalde JI, Boix L, Piñol V, Lacy AM, Saló J, Piqué JM, Castells A.

   Gastroenterology 2001; 120: 1084-1092.

5. Prognostic value of postoperative detection of blood circulating tumour cells in patients with colorectal cancer operated on for cure.

   Bessa X, Piñol V, Castellví-Bel S, Piazuelo E, Lacy AM, Elizalde JI, Piqué JM, Castells A.

   Annals of Surgery (en premsa)

2. JUSTIFICACIÓ DE LA TESI

Justificació general

El càncer colorectal (CCR) és una de les neoplàsies més freqüents en els països occidentals. A Catalunya, la seva incidència és de 30 casos/100.000 habitants en homes i de 20 casos/100.000 habitants en dones, representant la segona neoplàsia més freqüent en ambdós sexes (Esteve J, 1993). Així mateix, aquest tumor constitueix la segona causa de mort més freqüent per càncer. El pronòstic dels pacients afectes de CCR, i en general de qualsevol neoplàsia, ve determinat per la presència de disseminació metastàtica, essent aquesta la seva principal causa de mort.

El procés de creixement i disseminació metastàtica, és un procés complex i multifactorial (Liota LA, 1991) que inclou el creixement descontrolat i progressiu d'una clona cel·lular, l'aparició d'una neovascularització que aportí els nutrients fonamentals per al seu creixement, l'extravassació d'algunes d'aquestes cèl·lules neoplàstiques al torrent circulatori, i la seva posterior implantació i creixement en un òrgan distant (Figura 1).

En els darrers anys s'ha produït un gran avenç en el coneixement de la patogènia i la història natural del CCR. Tanmateix, avui en dia encara resten múltiples i importants aspectes fisiopatològics per aclarir. La present Tesi Doctoral ha aprofundit en dos dels mecanismes implicats en la progressió i disseminació tumoral. En primer lloc, s'ha descrit i caracteritzat els principals determinants moleculars que intervenen en el sistema de vigilància immunològica de l'hoste enfront el creixement tumoral. La caracterització de les molècules d'adhesió implicades en la interacció entre les cèl·lules del sistema immune i l'endoteli dels vasos neoformats, així com la recerca dels principals determinats moleculars que intervenen en aquest procés, ha de permetre avançar en el coneixement de les alteracions de la resposta immunitària a nivell del teixit tumoral, i en conseqüència, ha d'afavorir el desenvolupament de noves línies d'actuació per evitar la progressió del tumor.

El segon mecanisme implicat en la progressió i disseminació tumoral que aquesta Tesi Doctoral ha avaluat és el fenomen de mobilització de les cèl·lules neoplàstiques en els pacients amb CCR. Si es té en compte que l'entrada i desplaçament de les cèl·lules tumorals dins els vasos sanguinis és un factor determinant en l'aparició de metàstasis, la identificació d'aquestes cèl·lules circulants permetria caracteritzar amb més exactitud el procés de disseminació. D'aquesta manera, es disposaria d'un marcador de disseminació d'alta precisió amb possibles implicacions pronòstiques en els malalts amb CCR o que podria ésser útil per avaluar el potencial efecte deleteri de determinats tractaments en relació a la disseminació del tumor.

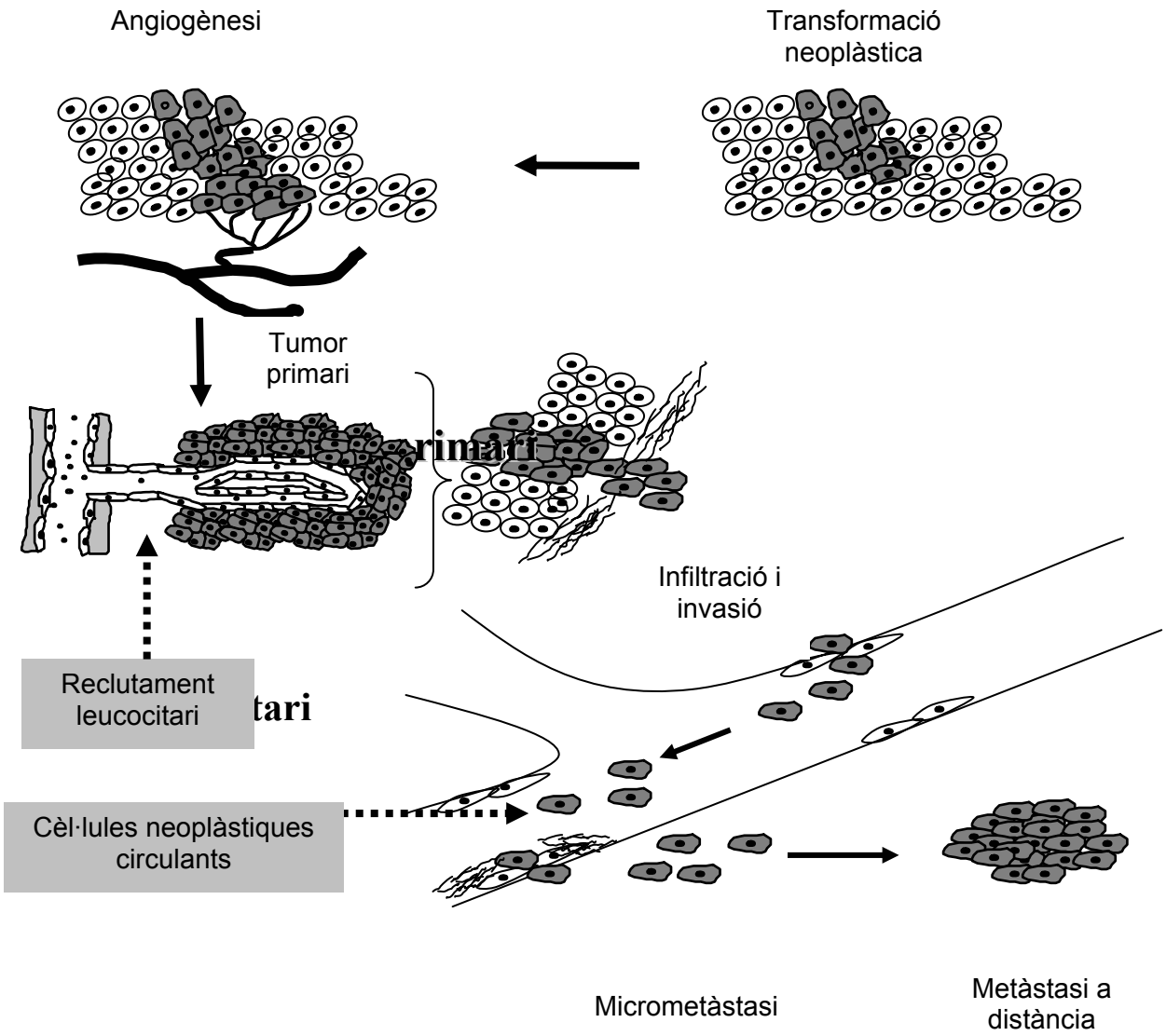

Figura 1. Esquema del procés de creixement, progressió tumoral i disseminació metastàsica

Estudi 1. Reclutament leucocitari en el càncer colorectal: paper de les molècules d'adhesió, l'òxid nítric i el factor de creixement transformant β1.

El pronòstic dels pacients amb CCR ve determinat pel creixement local i la disseminació a distància de la malaltia (Liota LA, 1991). Entre molts altres factors implicats, la proliferació neoplàstica depèn de la capacitat de l'hoste per defensar-se de les cèl·lules tumorals i en el que tenen un paper determinant els sistemes de vigilància immunològica (Ferrara N, 1991). El procés de vigilància immunològica depèn fonamentalment de la capacitat de les cèl·lules del sistema immune per a infiltrar el tumor, la qual cosa ve condicionada per la interacció d'aquestes amb l'endoteli dels vasos neoformats i la seva posterior extravasació al teixit tumoral on han d'exercir els seus efectes antineoplàstics (Yu W.G., 1997). Així, l'objectiu global d'aquest primer estudi va ésser caracteritzar les interaccions leucòcit-endoteli a la colocarcinogènesi experimental, el qual es concreta en els següents objectius específics:

1.1. Caracteritzar la interacció dels leucòcits amb les cèl·lules endotelials del vasos neoformats mitjançant microscopia intravital en el càncer de còlon experimental.

1.2. Analitzar l'efecte del bloqueig farmacològic de les diferents molècules d'adhesió endotelials en els processos de reclutament dels leucòcits (rodolament i adhesió) en el càncer de còlon experimental.

1.3. Investigar l'expressió de les diferents molècules d'adhesió endotelials *in vivo* en el càncer de còlon experimental

1.4. Avaluar la participació de diversos mediadors tumorals en els fenòmens d'interacció leucòcit-endoteli

Estudi 2. Detecció de cèl·lules colòniques a sang perifèrica de pacients amb càncer colorectal mitjançant transcripció reversa i posterior reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

El pronòstic dels pacients amb tumors malignes ve condicionat en gran manera per la disseminació metastàtica de la malaltia (Liota LA, 1991). El procés de disseminació metastàtica és un procés complex amb múltiples passes on la circulació hematògena de les cèl·lules tumorals és un procés cabdal. S'han efectuat múltiples intents per a identificar aquesta subpoblació de cèl·lules neoplàstiques circulants, però no ha estat fins el desenvolupament de tècniques de biologia molecular com la transcripció reversa i l'amplificació mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que això ha estat possible (Johnson PWM, 1995). Així, l'objectiu global d'aquest segon estudi va ésser determinar la presència de cèl·lules colòniques a sang perifèrica en pacients amb CCR mitjançant tècniques de RT-PCR, el qual es concreta en els següents objectius específics:

2.1. Desenvolupar una tècnica per a la detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb CCR mitjançant la determinació de l'ARN missatger codificant per a l'antigen càrcino-embrionari (CEA).

2.2. Avaluar la sensibilitat i especificitat de la tècnica en malalts amb CCR.

2.3. Avaluar la utilitat clínica de la detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb CCR.

Estudi 3. Influència de la cirurgia en la mobilització de cèl·lules neoplàstiques: colectomia assistida per laparoscòpia *versus* colectomia oberta

A l'actualitat, existeixen múltiples evidències que demostren que la manipulació quirúrgica del tumor durant l'acte operatori afavoreix el despreniment i mobilització de les cèl·lules neoplàstiques (Weitz J, 1998; Sales JP, 1999; Hayashi N, 1999; Patel H, 2002). A més, s'ha suggerit que aquest fet és més acusat quan s'utilitzen tècniques laparoscòpiques, les quals han suposat un autèntic revulsiu en el món de la cirurgia. En aquests sentit, s'ha qüestionat la seguretat oncològica de la cirurgia laparoscòpica en el tractament del CCR pel que fa a un potencial efecte deleteri en relació a la disseminació tumoral, concretament en relació a un major índex de recurrència i l'aparició d'implants tumorals en els punts d'inserció dels tròcars (Wexner S, 1995; Mathew G, 1996; Jacobi CA, 1997). Malgrat la confirmació de la seguretat i l'eficàcia de la tècnica està condicionada als resultats d'assaigs clínics prospectius i aleatoritzats (Lacy AM, 2002), la importància clínica d' aquest fenomen justifica la seva exploració amb altres aproximacions metodològiques. Així, l'objectiu global d'aquest tercer estudi va ésser avaluar la repercussió de les diferents modalitats de tractament quirúrgic (laparoscòpica i convencional) sobre la mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el CCR, el qual es concreta en els següents objectius específics:

3.1. Comparar l'efecte de la cirurgia laparoscòpica i de la cirurgia convencional en la mobilització de cèl·lules neoplàstiques en sang perifèrica durant i al final de la intervenció.

3.2. Comparar l'efecte de la cirurgia laparoscòpica i de la cirurgia convencional en la mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el territori portal durant la intervenció.

3.3. Comparar l'efecte de la cirurgia laparoscòpica i de la cirurgia convencional en la mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el líquid peritoneal durant la intervenció.

Estudi 4. Avaluar la significació pronòstica de la detecció preoperatòria de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica en pacients amb càncer colorectal.

L'establiment del pronòstic dels pacients amb cancer colorectal ve determinat fonamentalment per criteris histològics com l'afectació ganglionar o la profunditat de penetració tumoral. No obstant, aquests paràmetres no són prou acurats per a predir el pronòstic individual de cada pacient. Amb aquesta finalitat, s'han desenvolupat tècniques de biologia molecular per a la detecció de malaltia mínima residual en moll de l'ós (Gaerhard M, 1994) o en ganglis limfàtics (Hayashi N, 1995), les quals han demostrat la seva utilitat pronòstica en pacients amb CCR. Per altra banda, la informació referent al valor pronòstic de la detecció de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèric, un mètode atractiu per la seva simplicitat, és limitada i sovint contradictòria. Per això, l'objectiu global d'aquest quart estudi va ésser avaluar la significació pronòstica de la detecció a sang perifèrica de cèl·lules neoplàstiques mitjançant tècniques de RT-PCR en pacients amb CCR, el qual es concreta amb els següents objectius específics:

4.1. Establir el significat pronòstic de la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb CCR sobre la supervivència i la recurrència tumoral.

4.2. Establir el significat pronòstic de la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants en un subgrup de pacients amb CCR intervinguts amb finalitat curativa sobre la supervivència i la recurrència tumoral.

Estudi 5. Valor pronòstic de la detecció postoperatòria de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica en pacients amb càncer colorectal operats amb finalitat curativa.

Com s'ha assenyalat prèviament, existeixen diverses evidències experimentals i clíniques que la manipulació tumoral durant l'acte quirúrgic pot afavorir la mobilització de cèl·lules neoplàstiques des del tumor primari (Weitz J, 1998; Sales JP, 1999; Hayashi N, 1999; Patel H, 2002). En aquest sentit, la presència de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica es podria considerar un marcador de malaltia mínima residual amb potencial implicació pronòstica. Per això, l'objectiu global d'aquest cinquè estudi va ésser avaluar la significació pronòstica de la detecció de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica mitjançant tècniques de RT-PCR a les 24 hores d'una cirurgia radical en pacients amb CCR, el qual es concreta en els següents objectius específics:

4.1. Establir el significat pronòstic de la persistència de cèl·lules neoplàstiques circulants a les 24 hores de la resecció quirúrgica amb finalitat radical.

4.2. Establir el pronòstic de l'aparició de cèl·lules neoplàstiques circulants a les 24 hores de la cirurgia en pacients amb determinació basalment negativa.

3. INTRODUCCIÓ

3.1. Epidemiologia i mecanismes moleculars en el càncer colorectal

El CCR és una de les neoplàsies més freqüents en els països occidentals. A Catalunya, la seva incidència se situa al voltant de 30 casos / 100.000 habitants en homes i 20 casos / 100.000 habitants en dones, el que la converteix en la segona neoplàsia més freqüent en ambdós sexes, darrera del càncer de pulmó i de mama, respectivament. Aquesta elevada incidència i els encara relativament poc satisfactoris resultats en el seu tractament, fan que el CCR esdevingui la segona causa més freqüent de mort per càncer en el nostre medi (Esteve J, 1993; Castells A, 2000a).

La major part dels casos corresponen a formes esporàdiques de la malaltia, tot i que en un percentatge elevat dels mateixos (15-25%) és possible recollir l'antecedent familiar de CCR i altres neoplàsies (Burt RW, 2000; Winawer SJ, 1997). Deixant de banda aquestes formes familiars, les quals poden correspondre a formes hereditàries amb baixa penetrança o trastorns poligènics amb participació de polimorfismes que modulen la influència de factors ambientals, existeixen dues síndromes hereditàries associades al CCR, la poliposi adenomatosa familiar (PAF) i el càncer colorectal hereditari no associat a poliposi (CCHNP) (Rustgi AK, 1994). Ambdues entitats, malgrat representar una proporció reduïda del total de neoplàsies colorectals, tenen una gran importància des d'un punt de vista fisiopatològic, clínic i terapèutic. En primer lloc, els coneixements adquirits en relació als factors que participen en el desenvolupament d'aquestes malalties hereditàries han permès conèixer els mecanismes implicats en el CCR esporàdic, ja que alguns dels gens que es troben mutats a nivell germinal a la PAF i el CCHNP també tenen un paper clau en aquesta darrera situació (Fearon ER, 1990). En segon lloc, la identificació dels gens responsables ha permès establir el diagnòstic presimptomàtic dels individus portadors de mutacions en aquests gens i, per tant, en risc de desenvolupar la malaltia, amb la conseqüent repercussió en les estratègies de cribratge (Giardiello FM, 2001). Per

últim, el diagnòstic molecular d'ambdues formes de CCR possibilita l'adopció de mesures terapèutiques més radicals, diferenciades de les emprades a les formes esporàdiques, la qual cosa hauria de tenir un impacte favorable en el pronòstic d'aquests malalts.

3.1.1. Càncer colorectal esporàdic

En els darrers anys, diversos estudis han permès establir les alteracions gèniques que participen en la patogènia del CCR esporàdic al llarg de la seqüència adenoma-carcinoma. En aquest model seqüencial, el desenvolupament del CCR reflecteix l'activació de determinats oncogens (*KRAS*) i la inactivació de diversos gens supressors (*APC, SMAD4, DCC, TP53*). L'acumulació d'aquestes alteracions, més que no pas l'ordre en que s'han adquirit, és la responsable de la transformació i progressió neoplàstica (Fearon ER,1990a) (Figura 2).

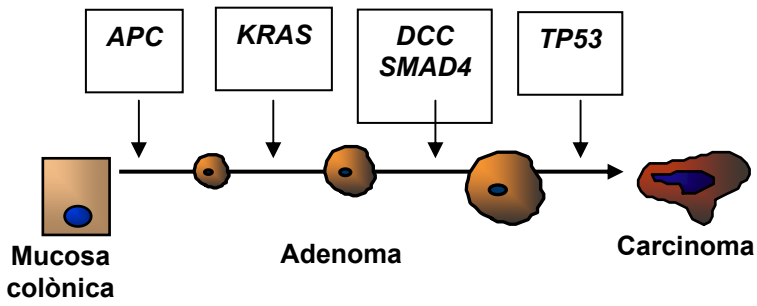

Figura 2. Model genètic en el càncer colorectal esporàdic

La presència de mutacions en el gen APC *–adenomatous polyposis coli-* constitueix un fenomen precoç i clau per al desenvolupament dels adenomes. Aquest gen participa en la regulació de la migració cel·lular a través de la interacció amb els microtúbuls, de l'adhesió cel·lular mediada per β-catenina i E-cadherina, i de la

transducció de senyal dependent de β-catenina. Així, la pèrdua o mutació d'APC, responsable de la degradació de β-catenina, comporta alteracions en la migració i adhesió de la cèl·lula, així com un increment de l'activitat transcripcional Tcf - c-Myc que indueix la proliferació cel·lular (Powell SM, 1992)

A banda de l'activació de la via APC-β-catenina-Tcf, la progressió des d'adenoma fins carcinoma requereix l'acumulació d'altres canvis genètics o cromosòmics. Entre les diferents molècules implicades destaca el proto-oncogen *KRAS*. La proteïna codificada per aquest gen, p21, pot trobar-se en dos estats funcionals segons el grau de fosforilització. La forma activa (p21-GTP) afavoreix l'activació de la cascada MAP quinasa, la qual té per finalitat promoure la síntesi de DNA. Aquesta funció està regulada per la seva activitat GTPasa intrínseca, la qual afavoreix el retorn a la forma inactiva (p21-GDP). La presència de mutacions en el gen KRAS comporta l'activació permanent de p21, el que incrementa la transducció de senyal que resultarà en un augment de l'activitat proliferativa de la cèl·lula (Macdonald F, 1997).

Una alteració cromosòmica molt freqüent en el CCR és la presència de pèrdues al·lèliques en el braç llarg del cromosoma 18 (Fearon ER, 1990). L'observació de delecions al·lèliques en un determinat cromosoma és suggestiu de la presència d'un gen supressor, els quals habitualment requereixen la inactivació de les dues còpies per a perdre la seva funcionalitat. Mitjançant anàlisis de pèrdua d'heterozigositat, ha sigut possible identificar dos gens, *DCC* i *SMAD4*, els quals poden estar implicats en la patogènia del CCR. En relació al gen *DCC –deleted in colon cancer-*, s'ha comprovat que la manca d'expressió de la proteïna que codifica es correlaciona amb una menor probabilitat de supervivència en malalts afectes de CCR. Per altra banda, el gen *SMAD4* codifica una proteïna que participa en la mediació intracelul·lar de la resposta al TGF-β. Estudis realitzats amb animals deficients han demostrat que la pèrdua aïllada de SMAD4 no indueix l'aparició de tumors intestinals, però que quan aquesta

s'associa a la pèrdua d'APC es desenvolupen adenomes que malignitzen fàcilment. TGF-β és una família de petits polipèptids amb diverses funcions en el creixement i desenvolupament cel·lular. La resposta de la cèl·lula al TGF-β depèn de receptors específics localitzats a la superfície cel·lular (RI i RII). La presència de mutacions en el gen *TGFBRII* (presents en el 20% dels CCR) o *SMAD4*, responsable de la poliposi juvenil, comporta que la cèl·lula s'escapi del control negatiu exercit pel TGF-β sobre la proliferació cel·lular (Takaku K, 1998).

El gen supressor *TP53* està localitzat al braç curt del cromosoma 17. La proteïna codificada per aquest gen, p53, inhibeix el creixement cel·lular actuant com a factor de transcripció, de tal manera que promou la transcripció de gens que codifiquen proteïnes amb activitat supressora. Així, en el moment que es produeix una lesió del DNA hi ha un ràpid increment del nivells de p53, el que comporta l'aturada del cicle cel·lular en fase G1 donant temps a la cèl·lula per a que repari el dany genètic. Quan la reparació no és possible, p53 indueix apoptosi. Les cèl·lules amb mutacions o pèrdues al·lèliques de *TP53* no poden dur a terme aquestes funcions, per la qual cosa són incapaces d'aturar el procés neoplàstic (Hollstein M, 1991).

Per últim, és important fer constar que probablement existeixen altres gens involucrats en la patogènia del CCR esporàdic. De fet, diversos estudis han demostrat la presència de pèrdues d'heterozigositat en altres cromosomes (8p, 5q, 22q), el que suggereix la possible participació d'altres gens supressors avui per avui desconeguts (Vogelstein B, 1989; Castells A, 1999a).

3.1.2. Poliposi adenomatosa familiar

Es tracta d'una malaltia hereditària autosòmica dominant, amb una incidència aproximada d'un cas per 10.000 habitants. Des d'un punt de vista fenotípic, es caracteritza per la presència de nombrosos pòlips adenomatosos (més de 100) distribuïts al llarg del budell gros. El diagnòstic sol efectuar-se entre la segona i la quarta dècades de la vida. Aquesta malaltia presenta un alt potencial de malignització, de tal manera que si no s'efectua tractament quirúrgic, la pràctica totalitat de malalts desenvoluparan un CCR abans dels 50 anys. Sovint s'acompanya de manifestacions extraintestinals, entre les que destaca la presència d'adenomes gastroduodenals, hipertròfia pigmentària de la retina o tumors desmoides, situació que es coneix com síndrome de Gardner (Rustgi AK, 1994; Castells A, 2000a).

Mitjançant estudis de lligament genètic i posterior clonatge posicional, ha sigut possible identificar el gen responsable d'aquesta entitat, *APC -adenomatous polyposis coli-*, localitzat en el braç llarg del cromosoma 5 (Groden J, 1991). La presencia de mutacions germinals en aquest gen ha permès el diagnòstic molecular de la malaltia i, conseqüentment, la seva aplicació en el cribratge familiar de la mateixa (Powel SM, 1993). La distribució de les mutacions en *APC* és molt heterogènia, encara que la majoria introdueixen prematurament un codó de finalització, el que resulta en la síntesi d'una proteïna truncada. A més, recentment s'ha vist que el tipus de mutació somàtica d'APC ve condicionada per la localització de la mutació germinal, el que suposa una variació significativa de la hipòtesi del *two-hit* de Knudson que pressuposava que les dues mutacions eren independents (Fodde R, 2001).

Per altra banda, existeix una bona correlació genotip-fenotip, de tal manera que la localització de la mutació condiciona l'espectre clínic de la malaltia (Figura 3) (Sorvia C, 1998; Fodde R, 2001).

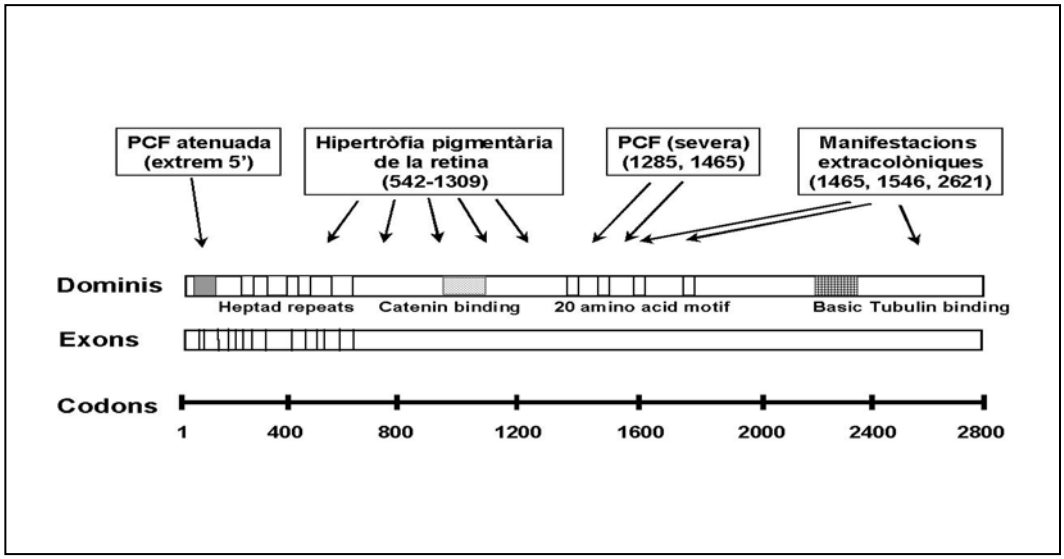

Figura 3. Correlació genotip-fenotip a la poliposi adenomatosa familiar

En aquest sentit, s'ha descrit una variant anomenada poliposi adenomatosa familiar atenuada la qual es caracteritza per un inici més tardà i un menor nombre de pòlips localitzats de manera preferent en el còlon dret, i que s'associa a mutacions en l'extrem 5' o 3' del gen *APC*. Els casos amb major nombre de pòlips habitualment s'associen a mutacions entre els codons 1285 i 1465, el desenvolupament d'hipertròfia pigmentària de la retina a mutacions en els codons 542-1309, i l'aparició de múltiples manifestacions extracolòniques a mutacions en els codons 1465, 1546 i 2621, tal i com es mostra a la Figura 3. Per últim, els malalts en els que no es possible detectar mutacions en *APC* (20-40%) presenten un fenotip molt més lleu, tant pel que fa a les manifestacions extracolòniques com en relació al número de pòlips en el còlon (Heinimann K, 1998). Aquestes darreres dades, així com les importants diferències fenotípiques entre les famílies afectes suggereix la possible existència d'altres gens implicats que exerceixin un paper modificador (Houlston R, 2001).

El gen *APC*, com s'ha assenyalat prèviament, juga un paper clau en la regulació de la migració cel·lular a través de la interacció amb els microtúbuls, de

l'adhesió cel·lular mediada per β-catenina i E-cadherina, i de la transducció de senyal dependent de β-catenina (Figura 4). La pèrdua o mutació d'*APC*, responsable de la degradació de β-catenina, comporta alteracions en la migració i adhesió de la cèl·lula, així com un increment de l'activitat transcripcional Tcf - c-Myc que indueix la proliferació cel·lular (Fodde R, 1992).

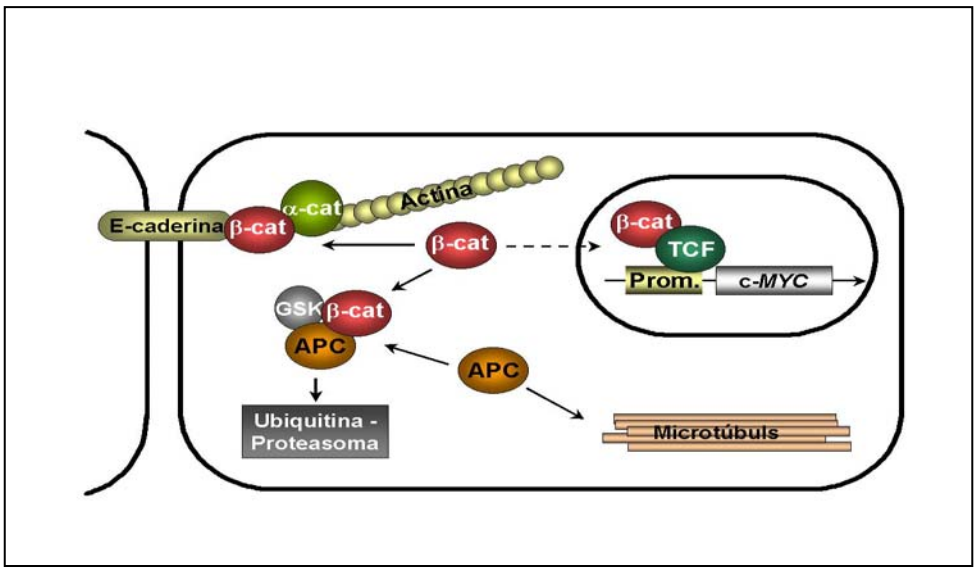

Figura 4. Funcions de la proteïna APC

L'estratègia recomanada per al cribratge de la poliposi adenomatosa familiar es basa en mesures de consell genètic que inclouen la realització de l'anàlisi mutacional del gen *APC* i l'assessorament als familiars en relació al risc que comporta la malaltia, la importància que té el seguiment i la transcendència que pot tenir el resultat de la prova genètica (Powel SM, 1993; Giardello FM, 1997). En els individus portadors de mutacions o en aquells en els que no ha estat possible determinar la seva presència, el cribratge contempla la pràctica d'una sigmoidoscòpia anual. Si s'estableix el diagnòstic de poliposi, a banda d'indicar el tractament quirúrgic, cal fer un estudi d'extensió que inclogui fibrogastroscòpia, ortopantomografia i estudi del fons d'ull per tal de descartar la presència de manifestacions extracolòniques.

El tractament de la poliposi adenomatosa familiar és quirúrgic, ja sigui mitjançant proctocolectomia total amb reservori o colectomia subtotal amb preservació del recte i anastomosi ileorectal (Rustgi AK, 1994; Castells A, 2000a). Mentre la primera evita el risc d'un ulterior desenvolupament d'una neoplàsia rectal, aquest opció està gravada per un major nombre de complicacions postoperatòries i possiblement pitjor qualitat de vida. La selecció d'un tècnica quirúrgica depèn fonamentalment de les manifestacions de l'individu o de la família, recomanant-se la colectomia total en la majoria de pacients i reservant la subtotal per aquells casos en els que existeixen pocs pòlips en el recte i el fenotip familiar és lleu, o per a les formes atenuades (Bülow C, 2000). Tanmateix, alguns estudis suggereixen que la localització de les mutacions podria contribuir a decidir el tipus d'intervenció. Així, estaria indicat realitzar una colectomia subtotal quan les mutacions estiguessin localitzades en els codons 0-200 o posteriors als 1500, mentre que altres autors recomanarien posposar la colectomia quan les mutacions es troben entre els codons 1445 i 1580 degut a l'elevat risc de desenvolupar tumors desmoides després de la intervenció (Vasen HFA, 1996; Friedl W, 2001).

En els darrers anys, s'ha demostrat que els adenomes del pacients amb poliposi adenomatosa familiar presenten sobreexpressió de ciclooxigenasa 2 (COX-2), la isoforma induïble d'aquest enzim el qual participa en el metabolisme de les prostaglandines (Gupta RA, 2001). Paral·lelament, s'ha observat que la utilització d'antiinflamatoris no esteroidals redueix el nombre de pòlips que presenten aquests pacients (Gupta RA, 2001). Aquests resultats també s'han observat amb la utilització d'inhibidors específics de COX-2 (Steinbach G, 2000), mentre que estudis experimentals amb ratolins deficients per a *APC* (APC^{Min} o $APC^{\Delta 716}$) i per a COX-2 han confirmat la importància patogènica d'aquest isoenzim i el potencial efecte beneficiós d'aquests fàrmacs. No obstant, la utilització d'inhibidors selectius de COX-2 està limitada als pacients tractats quirúrgicament amb preservació del recte, per tal d'evitar l'aparició de nous pòlips en aquest segment (Gupta RA, 2001).

3.1.3. Càncer colorectal hereditari no lligat a poliposi (CCHNP)

Es tracta d'una malaltia hereditària amb un patró autosòmic dominant, que es caracteritza pel desenvolupament precoç de CCR, de predomini en el còlon dret i amb una elevada tendència a presentar lesions sincròniques o metacròniques, així com neoplàsies d'altre origen (endometri, estómac, sistema urinari, ovari, vies biliars, budell prim, entre d'altres). Histològicament, el tumor presenta unes característiques relativament constants, donat que es tracten de tumors amb abundant presència de moc i pobrament diferenciats (Rustgi AK, 1994; Castells A, 2000a).

Existeixen importants variacions en relació a l'estimació de la seva incidència fruit del limitat nombre d'estudis poblacionals i d'una probable diversitat geogràfica. No obstant, el factor més determinant per a les discordances en quant a la seva freqüència de presentació és la dificultat per a establir-ne la seva definició i, conseqüentment, el seu diagnòstic. Malgrat aquestes limitacions, a l'actualitat s'accepta que aquesta malaltia representaria un 0,5-2% del total de CCR (Aaltonen LA,1998; Wijnen JT, 1998; Percesepe A, 2001).

El diagnòstic de CCHNP s'estableix a partir de la història familiar, i la seva definició es basa en els criteris establerts a la reunió d'Amsterdam (Vasen HFA, 1991) (Taula 1A). Darrerament, s'han ampliat els criteris diagnòstics (Amsterdam II) per a donar un major protagonisme a les neoplàsies extracolòniques (Vasen HF, 1999) (Taula 1B).

CRITERIS D'AMSTERDAM I
1. Tres o més familiars afectes de CCR, un d'ells familiar de primer grau dels altres dos, i 2. Dues generacions consecutives afectes, i 3. Diagnòstic d'almenys d'un dels casos abans dels 50 anys, i 4. Exclusió de la poliposi adenomatosa familiar

Taula 1A. Criteris d'Amsterdam I

CRITERIS D'AMSTERDAM II
1. Tres o més familiars afectes de tumors associats al CCHNP (CCR, endocrí, mama, urèter, pelvis renal, estómac, ovari, budell prim), un d'ells familiar de primer grau dels altres dos, i 2. Dues generacions consecutives afectes, i 3. Diagnòstic d'un dels casos afectes abans dels 50 anys, i 4. Exclusió de la poliposi adenomatosa familiar

Taula 1B. Criteris d'Amsterdam II

Des del punt de vista molecular, el CCHNP es caracteritza per l'existència de múltiples mutacions somàtiques que afecten de manera preferent a fragments repetitius d'ADN (microsatèl·lits) distribuïts al llarg del genoma (Ionov Y, 1993; Chung DC, 1995). Aquest fenomen, anomenat inestabilitat de microsatèl·lits, tradueix l'acumulació d'errors en la replicació de l'ADN, els quals són conseqüència de mutacions en els gens responsables de la seva reparació. La identificació de mutacions germinals en aquests gens -*hMSH2, hMLH1, hMSH6, hMLH3, hPMS1,*

hPMS2- ha permès definir la base genètica d'aquesta malaltia (Leach FS, 1993; Chung DC, 1995).

La reparació dels errors que tenen lloc durant la replicació de l'ADN (errors d'aparellament i petites insercions/delecions d'una o dues bases) s'inicia per la unió d'heterodímers MSH2-MSH6 al fragment danyat. Aquesta primera fase va seguida per un canvi conformacional d'aquestes molècules el que facilita la unió del complex MLH1-PMS2. Posteriorment, es produeix l'escissió de la cadena d'ADN afecta i la síntesi d'una de nova. Quan s'han de reparar insercions/delecions més llargues, probablement intervé el complex MSH2-MSH3 (Chung DC,1995) (Figura 5).

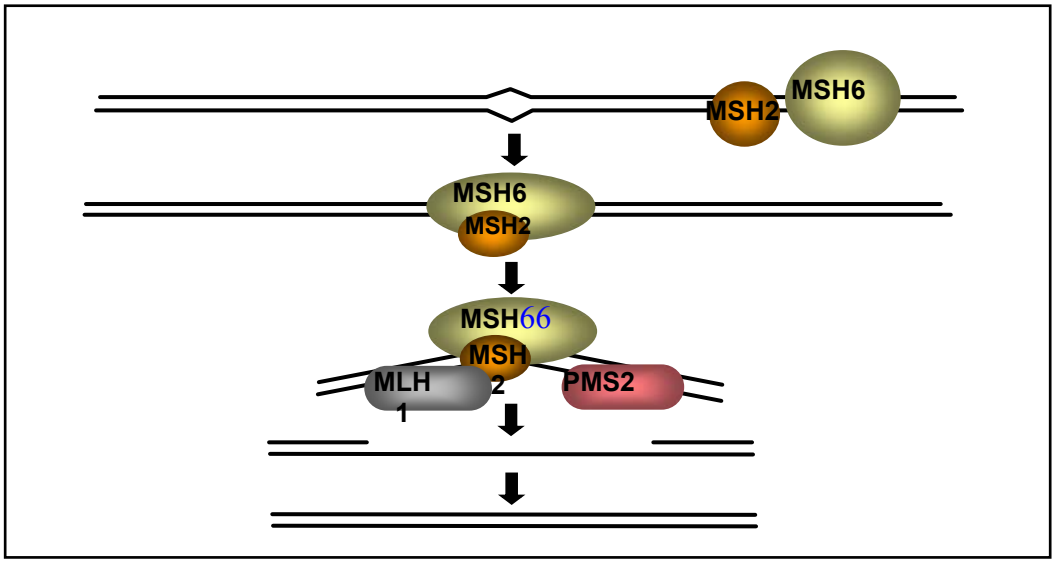

Figura 5. Mecanisme de reparació dels errors de replicació de l'ADN.

La presència de mutacions germinals en alguns d'aquests gens comporta que la cèl·lula tingui un mecanisme reparador deficient, el que es tradueix en l'acumulació de mutacions somàtiques a dos nivells. Per una banda, a nivell de microsatèl·lits, la majoria dels quals estan localitzats en ADN intrònic i, per tant, la seva afectació no té un significat patològic. Per altra, els errors de replicació també poden afectar a unitats repetitives de l'ADN incloses dins els marcs de lectura de diferents gens (*TGF-β,*

IGFRII, BAX, entre d'altres), alguns dels quals juguen papers fonamentals en la regulació del creixement, diferenciació o mort cel·lular (Chung DC, 1995).

Donat l'elevat risc de desenvolupar un CCR (superior al 80% al llarg de la vida dels individus amb mutacions germinals en els gens *hMSH2* i *hMLH1*) (Vasen HF, 2001), diversos autors suggereixen la possibilitat d'efectuar una colectomia profilàctica en tots els individus pertanyents a famílies que compleixen els criteris diagnòstics de CCHNP i que es demostrin portadors de mutacions en aquests gens (Giardiello FM, 2001). No obstant, no existeixen estudis que demostrin que aquesta actuació millori el pronòstic d'aquest individus, de la mateixa manera que tampoc s'ha demostrat l'eficàcia de la histerectomia profilàctica davant l'elevat risc de desenvolupar una neoplàsia d'endometri. Menys controvertida resulta la decisió terapèutica en relació a la tècnica quirúrgica més adient per al tractament dels pacients que han desenvolupat CCR. Donat l'elevat risc de presentar lesions metacròniques al llarg del seu seguiment, la pràctica d'una colectomia total o subtotal podria constituir una estratègia adequada. De nou, cal dir que no existeixen estudis controlats que confirmin la validesa d'aquesta aproximació terapèutica.

En els darrers anys s'ha demostrat que la vigilància periòdica mitjançant colonoscòpies millora el pronòstic dels individus pertanyents a famílies amb criteris de CCHNP. Així, la realització d'una colonoscòpia cada 2-3 anys s'associa a una disminució de la probabilitat de desenvolupar CCR i a un augment de la supervivència (Järvinen HJ, 2000).

Les recomanacions actuals en els pacients pertanyents a famílies amb criteris de CCHNP contempla la realització de l'anàlisi mutacional dels gens *hMSH2* i *hMLH1* (Giardiello FM, 2001; AGA, 2001). En els individus portadors de mutacions o en aquells casos en els que no és possible determinar-ne la seva presència, la pràctica d'una colonoscòpia cada 1 ó 2 anys a partir dels 25-30 anys (ó 10 anys abans de l'edat de diagnòstic del familiar afecta més jove) constitueix l'estratègia més adequada. A més, en funció del predomini de neoplàsies d'un altre origen en el si d'una

determinada família, és convenient efectuar altres exploracions dirigides a descartar la seva presència.

Per últim, en els darrers anys han aparegut diversos estudis que suggereixen la detecció del fenomen d'inestabilitat de microsatèl·lits com a mètode de cribratge per a detectar a pacients amb CCHNP (Rodriguez-Bigas MA, 1997; Boland CR, 1998). En aquest sentit, a banda dels individus pertanyents a famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam, és recomanable estudiar l'existència d'aquest fenomen en tots aquells pacients amb CCR que presenten unes determinades característiques demogràfiques i/o familiars, les quals venen definides pels criteris de Bethesda. En aquells casos que es detecta la presència d'inestabilitat de microsatèl·lits, és necessari confirmar el diagnòstic de CCHNP mitjançant la corresponent anàlisi mutacional.

3.2. Invasió i metàstasis en el càncer colorectal

El procés de disseminació tumoral consta d'una sèrie d'etapes complexes i interdepenents, totes elles necessàries per a que es produeixi un focus tumoral a distància del tumor primari. Així, les cèl·lules tumorals que donaran lloc a la metàstasi han de sobreviure a una sèrie de mecanismes de defensa del propi hoste que tracten d'impedir aquest fenomen. Les principals etapes del procés de disseminació metastàtica es representen a la Figura 1 i són els següents:

1) Un cop produïda la transformació neoplàstica, la proliferació cel·lular ve afavorida per l'aport de nutrients a partir del microentorn mitjançant difusió.
2) La neovascularització o angiogènesi és necessària per al creixement del tumor més enllà d'un diàmetre d'1-2 mm. La síntesi i secreció de diferents molècules angiogèniques, juntament amb la supressió de diferents molècules inhibidores són responsables de la formació d'una xarxa de capil·lars que neix del teixit circumdant del propi hoste.
3) L'hoste intenta evitar el creixement del teixit tumoral mitjançant els sistemes de immunovigilància.
4) Algunes cèl·lules tumorals poden inhibir l'expressió de molècules cohesives i adquirir una major mobilitat, separant-se així de la lesió primària. La invasió de l'estroma de l'hoste per part de les cèl·lules tumorals es produeix mitjançant una sèrie de mecanismes paral·lels. Els capil·lars i les vènules de paret fina, com els canals limfàtics, ofereixen una escassa resistència a la penetració de les cèl·lules tumorals i constitueixen les rutes més freqüents per a l'entrada de les cèl·lules tumorals al torrent circulatori.
5) A continuació es produeix la separació i embolització de cèl·lules tumorals aïllades o en forma d'agregats cel·lulars, encara que la gran majoria de les cèl·lules tumorals que passen al torrent circulatori són ràpidament destruïdes.

6) Les cèl·lules tumorals que sobreviuen en el torrent circulatori s'han d'aturar en els llits capil·lars dels òrgans a distància mitjançant adhesió a les cèl·lules endotelials dels capil·lars o membranes basals subendotelials.
7) Les cèl·lules tumorals, especialment les que formen agregats, poden proliferar a l'interior dels vasos sanguinis, però la majoria d'elles s'extravassen i penetren en el parènquima de l'òrgan a través de mecanismes similars als que actuen durant la invasió.
8) Les cèl·lules tumorals que presenten els receptors cel·lulars adequats a la seva superfície poden respondre a factors de creixement paracrins i, d'aquesta forma, proliferar en el parènquima de l'òrgan.
9) Les cèl·lules metastàtiques tenen que evitar ésser destruïdes per les defenses de l'hoste, entre les que destaquen la resposta immune específica i inespecífica.
10) Per a que una metàstasi pugui adquirir una massa de diàmetre superior a 1-2 mm. necessita la formació d'una xarxa vascular.

El present projecte de Tesi Doctoral aprofundeix en dos aspectes claus del procés de disseminació metastàtica: els mecanismes immunològics de l'hoste per a evitar el creixement tumoral, i la mobilització de les cèl·lules neoplàstiques un cop aquestes han escapat cap el torrent circulatori.

A l'hora d'estudiar la funció del sistema immune en el procés de disseminació metastàtica cal tenir en compte l'heterogeneïtat antigènica de les neoplàsies, la immunogenícitat intrínseca de les cèl·lules metastàtiques i la capacitat de l'hoste per reconèixer i destruir les cèl·lules tumorals autòctones. Avui en dia, es reconeix la heterogeneïtat dels tumors respecte a la antigenícitat, immunogenícitat i susceptibilitat a la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos, a les cèl·lules citotòxiques naturals (*natural killers*, NK), a les cèl·lules T i cèl·lules citotòxiques activades per limfoquines, als limfòcits que infiltren els tumors, i al tractament amb limfòcits T citotòxics (Radinsky R, 1996). En alguns sistemes tumorals, la depressió de la reactivitat immunològica

augmenta la incidència de metàstasis tant espontànies com experimentals (Fidler IJ, 1980).

Per altra banda, la formació de metàstasi per via hematògena té lloc en una sèrie d'etapes consecutives: penetració dels vasos sanguinis i/o limfàtics, alliberació i supervivència d'agregats de cèl·lules tumorals en el torrent circulatori, detenció i adhesió dels agregats en els petits canals vasculars dels òrgans a distància, invasió de la paret d'aquests vasos per part de les cèl·lules tumorals, extravasació al teixit subjacent i multiplicació, creixement d'un estroma vascularitzat i, per últim, creixement del propi focus tumoral.

El número d'agregats tumorals a la sang sembla estar correlacionat amb la duració clínica, la mida del tumor primari i la presència de zones necròtiques dins el tumor, les quals afavoririen un ràpid accés de les cèl·lules al sistema circulatori (Weiss L, 1985). Tanmateix, és important assenyalar que la presència de cèl·lules neoplàstiques a la sang és necessària, però no suficient, per a la posterior formació de metàstasis. Així, la gran majoria de les cèl·lules tumorals que penetren en el sistema circulatori són ràpidament eliminades. Aquest procés pot ésser degut a característiques intrínseques de les cèl·lules, com la deformabilitat, agregació o presència de molècules d'adhesió en la seva superfície (Liotta LA, 1976; Weiss L, 1992). Per altra banda, factors de l'hoste com la turbulència de la sang, les cèl·lules citotòxiques naturals, els macròfags i les plaquetes, també poden influir en la supervivència dels èmbols tumorals (Fidler IJ, 1985; Tsuruo T, 1986). En aquest sentit, la probabilitat de que una cèl·lula neoplàstica sobrevisqui a la sang augmenta quan aquesta forma agregats amb altres cèl·lules tumorals (Liota LA,1976). Els dipòsits de fibrina, l'agregació de plaquetes i l'adhesió al voltant dels èmbols tumorals pot protegir a les cèl·lules tumorals circulants contra traumes físics, facilitar-ne la seva aturada als llits capil·lars, i protegir-les enfront el sistema immunitari de l'hoste (Gorelik E, 1987). La major supervivència dels èmbols tumorals es tradueix amb una major probabilitat de formació de metàstasis a distància.

3.3. Tractament del càncer colorectal

El tractament del CCR depèn fonamentalment del seu estadi evolutiu i de la seva localització. L'únic tractament amb finalitat curativa és el tractament quirúrgic. La finalitat de la cirurgia és l'exèresis del tumor primari amb uns marges de resecció amplis, així com de tots els ganglis adjacents amb el fi de disminuir la probabilitat de recidiva de la malaltia (Nelson H, 2000).

3.3.1. Tractament del tumor primari

Múltiples estudis clínics i experimentals han demostrat que la manipulació tumoral afavoreix el despreniment i mobilització de cèl·lules neoplàstiques durant l'acte quirúrgic (Nishizaki T, 1990; Brown DC, 1995; Eschwêge P, 1995; Denis MG, 1996; Funaki NO, 1998b; Miyazono F, 1999; Weitz J, 1998; Sales JP, 1999; Hayashi N, 1999; Garcia-Olmo D, 1999; Patel K, 2002). Aquest fet ha comportat que en els darrers anys s'hagin revisat les diferents tècniques quirúrgiques. Fruit d'aquesta revisió, s'ha extès l'ús de la tècnica *non-touch* basada en la lligadura dels vasos aferents i eferents del tumor abans de la seva manipulació quirúrgica per tal d'evitar la dispersió de cèl·lules neoplàstiques al torrent circulatori (Turnbull RB Jr, 1967), així com la tècnica de resecció completa del mesorecte en el càncer de recte amb l'objectiu de reduir la probabilitat de recidiva locoregional (Douglas HO Jr, 1986; Martling AL, 2000; Kapiteijn E, 2001).

Entre altres avenços en la cirurgia del CCR que han permès disminuir la morbi-mortalitat relacionada destaquen els mètodes d'acondicionament o neteja del còlon i la millora de la instrumentació quirúrgica, en especial el desenvolupament de tècniques de sutura mecànica.

L'aplicació de la cirurgia laparoscòpica a la patologia intraabdominal ha suposat una autèntica revolució en el tractament d'aquests pacients. Estudis clínics han demostrat que la cirurgia laparoscòpica presenta una disminució dels fenòmens

inflamatoris tant locals com sistèmics respecte a la cirurgia convencional (Delgado S, 2001). Entre els beneficis obtinguts amb aquesta aproximació es troben la disminució del dolor postoperatori, el que afavoreix la mobilització precoç del pacient amb la conseqüent reducció del risc de complicacions respiratòries i trombòtiques, del període d'ili, de l'estada hospitalària i de la convalescència (Lacy AM, 1995).

Múltiples estudis han demostrat l'aplicabilitat i reproductibilitat de la cirurgia laparoscòpica en el CCR (Franklin ME, 1996; Fleshman JW, 1996; Milsom JW, 1998; Lacy AM, 1998). Tanmateix, encara existeix certa controvèrsia sobre la seva seguretat d'aquesta aproximació en el tractament de malalts oncològics. Aquest fet es degut a que estudis en animals d'experimentació havien suggerit que les característiques tècniques de la cirurgia laparoscòpica (pressió intraabdominal, temperatura, gas) podien afavorir el creixement tumoral, la disseminació hematògena i l'exfoliació intraperitonial de cèl·lules tumorals (Allendorf JD, 1995; Mathew G, 1996; Wheland R, 1996; Jacobi CA, 1997; Bouvy ND, 1997; Watson RW, 1998). Paral·lelament, s'han descrit alguns casos de pacients amb CCR que han desenvolupat metàstasis en els llocs d'inserció dels tròcars (*port-site metastases*) (Berends FJ, 1994; Wexner S, 1995; Vukasin P, 1996). No obstant, en el moment actual existeixen múltiples estudis que demostren que aquesta eventualitat és extremadament infreqüent quan es tenen determinades precaucions a l'hora de manipular el tumor (Franklin ME, 1996; Fleshman JW, 1996; Milsom JW, 1998; Lacy AM, 1998). Així mateix, dos estudis prospectius que avaluaren la disseminació peritoneal mitjançant tècniques de citologia o immunocitologia, no van observar diferències entre la cirurgia laparoscòpica i la convencional (Buchmann P, 1996; Kim SH, 1998). Per últim, i més important, els resultats a llarg termini del primer estudi controlat i aleatoritzat que compara ambdues aproximacions quirúrgiques ha demostrat que la cirurgia laparoscòpica s'associa a una menor probabilitat de recidiva tumoral i a una major supervivència en malalts amb càncer de còlon. Aquesta superioritat es deu, fonamentalment, a les diferencies obtingudes en els pacients amb estadi III (Lacy AM, 2002). La confirmació d'aquests

resultats per part dels estudis multicèntrics en curs convertiria la colectomia assistida per laparoscòpia en el tractament d'elecció en els malalts amb càncer de còlon.

3.3.2 Tractament complementari

A l'any 1990, una reunió de consens va recomanar la realització de tractament adjuvant mitjançant quimioteràpia als pacients amb tumors en estadi III de la classificació TNM (NIH Consensus Conference, 1990). A la mateixa reunió, no es va aconsellar una teràpia específica per aquells pacients amb lesions en estadi II. Actualment, persisteix la controvèrsia sobre la necessitat d'efectuar tractament complementari en aquest darrer grup de malalts, ja que el seu relatiu bon pronòstic redueix el potencial efecte beneficiós del tractament (Boland CR, 2000). Així, estudis inicials de la dècada dels 90 van observa que el tractament complementari en pacients en estadi B de Dukes disminuïa el risc de recurrència tumoral, però sense arribar a assolir significació estadística (Moertel CG, 1995b). Posteriorment, els resultats de dos estudis prospectius han demostrat un efecte beneficiós del tractament complementari en pacients en estadi II, tot i que aquests no anaven específicament dirigits a avaluar el pronòstic d'aquest subgrup de malalts (IMPACT B2, 1999; Mamounas E, 1999). Aquesta disparitat de resultats suggereix que és necessari identificar nous indicadors de mal pronòstic (afectació peritoneal, invasió venosa, afectació marges, perforació tumoral, etc.) que permetin seleccionar aquells pacients en estadi II amb una major probabilitat de recidiva i, per tant, que es puguin beneficiar de tractament adjuvant de manera similar al que passa en pacients amb tumors en estadi III (Petersen VC, 2002).

En els pacients amb càncer colorectal en estadi III de la classificació TNM, està universalment acceptat la necessitat de realitzar tractament complementari amb quimioteràpia. Així, múltiples estudis han demostrat l'efecte beneficiós del tractament en relació al risc de recidiva i a la probabilitat de supervivència (Moertel CG, 1995a; IMPACT, 1995; O'Conell MJ, 1998).

El tractament del càncer de recte mereix alguns comentaris específics. Tot i que la cirurgia és el tractament d'elecció en aquests pacients, les peculiaritats anatòmiques del recte (un ric drenatge limfàtic i les escasses barreres amb estructures adjacents) determinen que existeixi un elevat risc de recidivas locoregional (25% en pacients en estadi II i 50% en pacients en estadi III). Aquest fet demostra la conveniència d'efectuar tractament complementari. El tractament adjuvant es basa en la combinació de radioteràpia (pre o post-operatòria) i quimioteràpia, ja que la realització únicament de tractament local disminueix el risc de recidiva a aquest nivell però no evita la aparició de metàstasis a distància (Medical Research Council Rectal Cancer Working Party, 1996). És important assenyalar que, malgrat el tractament combinat en el càncer de recte ha demostrat ésser útil per a disminuir la probabilitat de recidiva local i la mortalitat associada al càncer (Krook JE, 1991), tan sols un estudi ha aconseguit demostrar una milloria en la supervivència global (Swedish Rectal Cancer Trial, 1997).

3.4. Pronòstic dels pacients amb càncer colorectal

El pronòstic dels pacients amb CCR depèn de diversos factors clínics, histològics i biològics. En relació als primers, és ben conegut que la perforació i l'oclusió com a manifestació inicial del tumor s'associen a un pitjor pronòstic. Per altra banda, el factor predictiu més determinant pel que fa a la supervivència i recidiva tumoral és l'estadi tumoral, el qual té en compte la penetració en la paret del budell, l'afectació ganglionar i la presència de metàstasis a distància.

L'estadi evolutiu del CCR pot establir-se d'acord amb la classificació de Dukes (modificada per Astler i Coller) (Taula 2) o el sistema TNM (Taula 3) de la *International Union Against Cancer* (Fleming ID, 1997). Ambdues classificacions es correlacionen amb el pronòstic dels malalts (Taula 4).

Estadi	**Extensió**
A	Penetració limitada a la mucosa
B1	Penetració fins la muscular pròpia
B2	Penetració fins la capa serosa
C1	Igual que B1 més metàstasi ganglionars
C2	Igual que B2 més metàstasi ganglionars
D	Metàstasi a distància o invasió parietal d'òrgans adjacents

Taula 2. Classificació de Dukes (modificada per Astler i Coller).

Estadi 0
Tis N0 M0 Carcinoma *in situ*

Estadi I
T1 N0 M0 Tumor que invadeix la submucosa
T2 N0 M0 Tumor que invadeix la muscular pròpia

Estadi II
T3 N0 M0 Tumor que invadeix a través de la muscular pròpia cap a la subserosa o cap a teixits pericòlics o perirectals no peritonitzats
T4 N0 M 0 Tumor que perfora el peritoni visceral o que invadeix directament altres òrgans o estructures

Estadi III
T1-4 N1 M0
T1-4 N2-3 M0
Qualsevol grau de penetració de la paret intestinal amb metàstasis en ganglis limfàtics regionals
N1 1 a 3 ganglis limfàtics pericòlics o perirectals afectats
N2 4 ó més ganglis limfàtics pericòlics o perirectals afectats
N3 Metàstasi a qualsevol gangli limfàtic al llarg d'un tronc vascular

Estadi IV
T1-4 N0-3 M1 Qualsevol invasió de la paret intestinal, amb o sense metàstasi a ganglis limfàtics però amb metàstasi a distància

Taula 3. Classificació TNM (AJCC) per al càncer colorectal.

Estadi TNM	**Supervivència als 5**
In situ	96-100 %
I	89-90 %
II	50-75 %
III	25-45 %
IV	< 5%

Taula 4. Pronòstic dels pacients amb càncer colorectal en funció de l'estadi TNM.

La presència de disseminació metastàtica és un dels factors amb major valor predictiu independent. Un 40-50% dels malalts amb CCR desenvolupen metàstasis hepàtiques, ja sigui de manera simultània amb el tumor primari (sincròniques, 15-25%) o al llarg del seguiment (metacròniques, 75-85%). En un terç d'aquests, el fetge és l'únic òrgan afecte, encara que únicament un 15-20% d'aquests pacients seran susceptible de resecció quirúrgica amb pretensió radical. El desenvolupament de metàstasis implica un pèssim pronòstic a llarg termini, amb una supervivència als 5 anys del 25-30% per els pacients sotmesos a cirurgia radical, i de menys del 5% en aquells amb malaltia irresecable (Castells A, 2002).

El valor pronòstic de l'estadi evolutiu del tumor justifica que aquest sigui el principal criteri a l'hora d'indicar la realització de tractament complementari. La eficàcia de la quimioteràpia en els pacients amb afectació ganglionar permet una reducció significativa de la mortalitat relacionada amb el càncer i un increment de la supervivència lliure de malaltia (Moertel GC, 1995a; IMPACT, 1995; O'Conell MJ, 1998). Com s'ha comentat, el paper de la quimioteràpia en els pacients sense afectació ganglionar és més controvertida (Moertel CG, 1995b; IMPACT B2, 1999; Mamounas E, 1999) i, per tant, és imprescindible la identificació de nous indicadors de mal pronòstic en aquest subgrup de malalts (Petersen VC, 2002).

Malgrat les diferents classificacions basades en les troballes anàtomo-patològiques permeten establir el pronòstic de manera global, cap d'elles possibilita la predicció del comportament individual d'un determinat malalt a fi de seleccionar aquells que més es poden beneficiar d'un seguiment estricte o d'un tractament adjuvant més intens. Donat que el pronòstic dels malalts intervinguts amb finalitat radical està condicionat per la recurrència de la malaltia, una estratègia vàlida per aconseguir aquest objectiu seria la identificació precoç de disseminació metastàtica oculta o microscòpica o, dit d'altra manera, de malaltia mínima residual. Altres aproximacions contemplen l'establiment del valor pronòstic de diferents marcadors moleculars

implicats en el creixement i/o la progressió tumoral (Campo E, 1992; Campo E, 1994; Castells A, 1997; Hernandez S, 2000).

3.5. Paper del reclutament leucocitari en el càncer colorectal

L'angiogènesis, o establiment d'una neovascularització tumoral, és un fenomen cabdal per al desenvolupament i creixement del tumor (Folkman J, 1995). Aquest procés, regulat per múltiples factors pro i antiangiogènics (Bessa X, 2000) (Taula 5), augmenta la superfície endotelial i així afavoreix la interacció de les cèl·lules amb la paret vascular.

La capacitat del sistema immune per infiltrar el teixit tumoral durant el procés de vigilància immunològica depèn de la capacitat d'aquestes cèl·lules de contactar amb l'endoteli vascular i penetrar en el teixit tumoral (Ferrara, 1996). El creixement del tumor pot ser conseqüència d'una inadequada resposta immune, ja sigui degut a una pobra immunogenicitat de les cèl·lules tumorals o per una baixa eficiència en la resposta del sistema immune (Todryk, 1998). El teixit tumoral humà es troba habitualment infiltrat per limfòcits, el que es considera com la manifestació principal de la resposta de l'hoste enfront del tumor (Rosenberg SA, 1996). En aquest sentit, les interaccions leucòcit-endoteli a la neovasculatura tumoral són fonamentals per al control del creixement tumoral ja que constitueixen el pas previ a la infiltració del teixit tumoral per part dels leucòcits a fi de poder exercir la seva activitat antineoplàstica (Yu WG, 1997). Així, està demostrat que la infiltració leucocitària a nivell del teixit tumoral s'associa a un millor pronòstic (Naito Y, 1998, Dolcetti R, 1999). A més, tant el propi procés inflamatori com la immunoteràpia s'han demostrat efectives en la reducció del creixement del tumor (Ghang AE, 1996).

El desenvolupament de tècniques de microscopia intravital ha permès estudiar *in vivo* els fenòmens d'interacció leucòcit-endoteli en diferents models experimentals.

	Activadors de la angiogènesi	Inhibidors de l'angiogènesis
Factors de creixement	Factor de creixement fibroblàstic bàsic (bFGF) Factor de creixement fibroblàstic àcid (aFGF) Factor de creixement transformant-α (TGF-α) Factor de creixement transformant-β (TGF-β) Factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) Factor de creixement Insulina-like (IGF) Factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) Angiotropina Angiogenina Factor de creixement placentari	
Proteases i inhibidors de les proteases	Catepsines Gelatinasa A, B Estromelisina Activador tipus uroquinasa del plasminogen (uPA)	Inhibidors tissulars de metaloproteases (TIMP-1, TIMP-2) Inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1)
Elements	Coure	Zinc
Oncogens	*c-myc* *ras* *c-jun*	*TP53* *Rb*
Enzims de transducció de senyal	Timidina fosforilasa Farnesil transferasa Geranil transferasa	
Citoquines	Interleuquina-1 Interleuquina-6 Interleuquina-8	Interleuquina-10 Interleuquina-12
Moduladors endògens	Alfa v Beta 3 integrina Angiopoetina-1 Angiostatina II Endotelina Eritropoietina Hipòxia Sintasa de l'òxid nítric Factor activador de plaquetes (PAF) Prostaglandina E Trombopoetina	Angiopoetina-2 Angiotensina Angiotensina II (AT2 receptor) Caveolina-1, Caveolina-2 Endostatina Angiostatina Interferó alfa Isoflavones Factor plaquetari IV Trombospondina Troponina-1

Taula 5. Factors estimuladors i inhibidors de l'angiogènesi

3.5.1. Mecanismes moleculars implicats en la interacció leucòcit-endoteli

El reclutament de leucòcits circulants cap a les àrees de creixement tumoral és paral·lel a l'observat en els processos inflamatoris, un procés finament regulat que consta de tres fases. En primer lloc, els leucòcits circulants interaccionen dèbilment amb les cèl·lules endotelials mitjançant un moviment de rodament o *rolling* al llarg de la paret de les vènules. Aquest fenomen de rodament és transitori i reversible, però si es produeix una activació dels leucòcits per l'acció de mediadors inflamatoris locals, els leucòcits activats s'adheriran fermament a la cèl·lula endotelial i finalment migraran a través de les unions intercel·lulars cap a l'espai intersticial (Springer TA, 1994) (Figura 6). Cadascuna d'aquestes etapes està regulada per uns determinats receptors de membrana coneguts com molècules d'adhesió, que s'expressen a la superfície del neutròfil i de la cèl·lula endotelial.

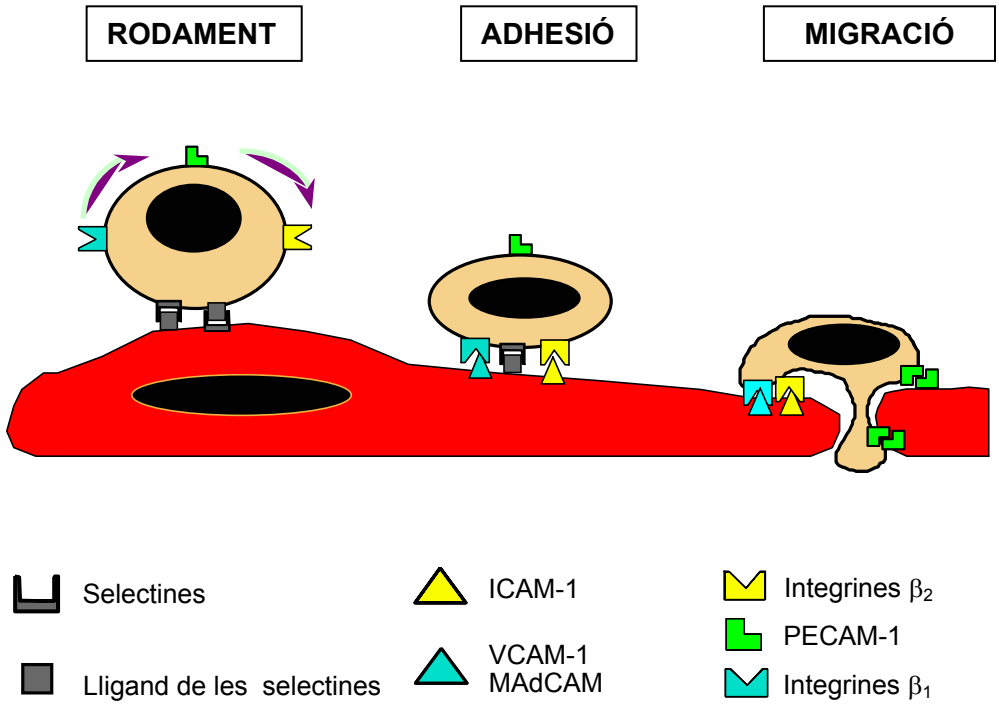

Figura 6. Esquema de la resposta immunitària a nivell del teixit tumoral. Inicialment els leucòcits roden per la paret vascular per l'expressió de les molècules d'adhesió de la família de les selectines (L-, P- i E-selectines) i els seus corresponents lligands. Posteriorment, part dels leucòcits en rodament s'adhereixen i migren gràcies a l'acció d'immunoglobulines endotelials (ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1) i els seus contrareceptors, les integrines leucocitàries β_1 o β_2.

Per tal d'iniciar les interaccions adhesives amb l'endoteli, les cèl·lules circulants han de realitzar un moviment de desplaçament des de la part central del flux vascular cap a la paret (Granger DN, 1994). Aquest desplaçament dels leucòcits es troba afavorida per les interaccions hidrodinàmiques amb els glòbuls vermells (Schmid-Schönbein GW, 1980). El rodament leucocitari es considera el resultat d'interaccions adhesives dèbils (baixa afinitat) que són suficients per a contrarestar les forces de dispersió (*shear stress*). Malgrat la velocitat del rodament leucocitari és proporcional al *shear stress*, aquesta dèbil activació leucocitària va acompanyada d'una reducció de la velocitat de rodament (Smith CW, 1989).

A l'actualitat, és ben conegut que les selectines i la integrina α4 (Berlin C, 1995; Panés J, 1998a) amb els seus corresponents lligands intervenen en el fenomen de rodament leucocitari. En funció del lloc on s'expressin, es distingeixen tres tipus de selectines: L-selectina, que està present a la membrana leucocitària; P-selectina, present a la cèl·lula endotelial i a les plaquetes; i E-selectina, que s'expressa únicament a la cèl·lula endotelial (Tedder TF, 1995). Els principals lligands de les selectines són els tetrasacàrids sialil-Lewis X i sialil-Lewis A, que són capaços d'unir-se al domini lectina comú a totes les selectines (Laskly LA,1992).

La molècula L-selectina s'expressa a la majoria de neutròfils, monòcits i eosinòfils. L-selectina s'ha implicat en la unió dels neutròfils a les cèl·lules endotelials activades però no a les cèl·lules quiescents, indicant que el lligant no s'expressa normalment a nivell de la cèl·lula endotelial (Jutila MA, 1989). La unió mediada per L-

selectina no requereix l'activació prèvia dels leucòcits. En aquest sentit, l'activació dels neutròfils per part de mediadors inflamatoris o citoquines resulta en una disminució de l'expressió de L-selectina a la membrana plasmàtica (Kishimoto TK, 1989). La molècula P-selectina se sintetitza de forma constitutiva a les cèl·lules endotelials i a les plaquetes, i s'emmagatzema en els cossos de Weibel-Palade i en els gränuls alfa, respectivament (McEver RP, 1991). P-selectina es distribueix en pocs minuts per la superfície cel·lular de les plaquetes i de les cèl·lules endotelials en resposta a un estímul, com per exemple la histamina, la trombina o els radicals de l'oxigen (Geng JG, 1990). També pot ser regulada a nivell transcripcional en resposta a estímuls com l'endotoxina o el factor de necrosi tumoral α (Sanders WE, 1992). L'estimulació de la circulació gastrointestinal amb lipopolisacàrid (LPS) resulta en un augment de P-selectina que perdura durant vàries hores (Issekutz AC, 1993). Finalment, E-selectina no es troba expressada en la superfície de les cèl·lules endotelials no activades, però és estimulada de manera trancripcional per diverses citoquines com interlequina-1, TNF-α i LPS (Fries JW, 1993).

Els fenòmens d'adhesió leucocitària són dependents d'un grup de molècules diferents de les selectines. Un dels grups és la família de les immunoglobulines presents majoritàriament a la membrana endotelial i que inclouen diferents molècules d'adhesió com les molècules d'adhesió intercel·lular 1 i 2 (ICAM-1 i ICAM-2), la molècula d'adhesió vascular (VCAM-1), la molècula d'adhesió plaqueta-cèl·lula endotelial (PECAM-1) i la molècula d'adhesió cel·lular dirigida contra mucosa (Mad-CAM-1). Un altre grup està constituït per les integrines leucocitàries que són els lligants més comuns de les immunoglobulines endotelials. Les integrines leucocitàries són proteïnes heterodimèriques formades per dos subunitats α i β associades per enllaços no covalents. Es coneixen fins a tretze integrines diferents en funció de les subunitats que les conformen. En els neutròfils, s'expressen només un tipus determinat d'integrines, en les quals la subunitat β és coneguda com CD18 i està unida a una de les tres subunitats α designades com CD11a, CD11b o CD11c. El CD11a/CD18 s'expressa

fonamentalment a la superfície dels neutròfils interaccionant amb ICAM-1 i ICAM-2 a la cèl·lula endotelial i promovent l'adhesió leucocitària (van de Stolpe A, 1996). El CD11b/CD18 és un altre membre de la família de les integrines leucocitàries i actua com a receptor de la molècula ICAM-1. L'acoblament de les dues proteïnes de membrana determina l'adhesió de neutròfils a la paret vascular i la seva posterior migració en molts models inflamatoris.

ICAM-1 i VCAM-1 juguen un important paper en l'adhesió ferma dels leucòcits a la cèl·lula endotelial en diferents tipus de processos inflamatoris aguts i crònics (Elizalde I, 1997; Sans M, 1999). ICAM-1 es troba basalment expressada en els leucòcits, fibroblasts, cèl·lules epitelials i endotelials. L'activació endotelial amb citoquines o LPS indueix un increment en la seva expressió. No obstant, l'expressió en els diferents llits vasculars és molt heterogènia (Panés J, 1996). La rellevança fisiològica de la regulació d'ICAM-1 a la cèl·lula endotelial queda demostrada pel fet que l'increment de l'expressió d'ICAM-1 s'associa generalment als màxims nivells d'adhesió leucocitària (Farhood A, 1995). VCAM-1 és una altra molècula d'adhesió endotelial amb una expressió constitutiva en les cèl·lules endotelials inferior a la d'ICAM-1, però que es veu intensament estimulada per citoquines i LPS (Neish AS, 1995). VCAM-1 és un important modulador del reclutament de limfòcits i monòcits. La integrina $\alpha 4\beta 1$ és el lligant del VCAM-1 i s'expressa a les cèl·lules mononuclears i als neutròfils activats (Elices MJ, 1990).

3.5.2. Interacció leucòcit-endoteli en el càncer colorectal experimental

El procés de reclutament leucocitari ha estat parcialment estudiat amb tècniques de microscopia intravital en diversos models de càncer experimental. En un model de rata amb implantació d'adenocarcinoma mamari, Ning et al van comprovar que tant en condicions basals com després de l'administració d'estímuls inflamatoris (fMLP, LPS o TNF-α), el grau d'interacció leucòcit-endoteli en el teixit tumoral era inferior en relació al teixit no tumoral. Tanmateix, en aquest estudi es va comprovar

que aquesta disminució no podia ser atribuïble al major *shear stress* a nivell dels vasos tumorals (Ning Z, 1992). Resultats similars es van obtenir en un model murí d'angiogènesi tumoral, observant-se una disminució del reclutament leucocitari en la vasculatura de dos tumors diferents (adenocarcinoma de mama i astrocitoma humà) en relació a la vasculatura normal. Malgrat l'estímul amb TNF-α va induir un augment del fenomen de rodament a nivell tumoral, de nou aquest increment va ésser inferior a l'observat en la neovasculatura del tumor (Fukumara D, 1995). En aquests dos estudis no es van caracteritzar els fenòmens d'adhesió ni les molècules d'adhesió responsables de la deficient interacció leucòcit-endoteli. Finalment, un estudi recent en un model de carcinoma pulmonar (*Lewis lung carcinoma*) va confirmar la manca de interacció o rodament dels leucòcits en els vasos neoformats en condicions basals respecte les vènules normals. Per altra banda, aquest estudi va confirmar la capacitat de la neovasculatura tumoral d'expressar E- i P-selectina davant un estímul depenent de LPS. Per últim, es va observar que l'increment del rodament a nivell de la neovasculatura tumoral no era suficient per a establir una adhesió ferma i posterior migració leucocitària, requerint l'administració addicional d'un potent mediador quemotàctic i pro-inflamatori (Borgström P, 1997). Per tal d'explicar la deficient interacció leucòcit-endoteli en aquests models tumorals experimentals es va suggerir que existia un dèficit de l'expressió de les principals molècules d'adhesió a nivell de la microcirculació tumoral, fet que no es va estudiar en cap dels models experimentals esmentats.

3.5.3. Quantificació de l'expressió de molècules d'adhesió endotelial en el teixit tumoral

Fins al moment, la quantificació de les molècules d'adhesió s'havia efectuat mitjançant tècniques immunohistoquímiques (Kuzu I, 1993) i citofluoromètriques (Piali L, 1995), el que comportava resultants heterogenis i controvertits. Aquest fet ve donat per limitacions tècniques en la quantificació de molècules amb una alta (ICAM-1) o baixa (VCAM-1) expressió constitutiva (Kuzu I, 1993; Zocchi MR, 1993; Silber A,

1994). Així, amb l'ús de tècniques immunohistoquímiques, s'han descrit increments en l'expressió de diferents molècules d'adhesió (ICAM-1, ICAM-2, PECAM-1, P- i E-selectina) en el càncer de mama (Fox SB, 1995), en el carcinoma de cèl·lules petites pulmonars (Staal-van den Brekel AJ, 1996), en hemangiomes (Kraling BM, 1996) i, finalment, d'ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina en el CCR (Nelson H, 1994; Ye C, 1995; Maurer CA, 1998). Contràriament, s'ha descrit una deficient expressió de VCAM-1 en el melanoma i el càncer de pulmó (Renkonen R, 1992), d'ICAM-1 (Griffioen A.W., 1996) i CD34 (Hellwig S, 1997) en el carcinoma renal, i d'E-selectina (Berger R, 1993) i VCAM-1 (Piali L, 1995) en el melanoma. La complexitat en la determinació de l'expressió de molecules d'adhesió endotelial en els vasos neoformats queda patent en estudis recents on s'impliquen factors angiogènics en la modulació d'aquestes glicoproteïnes adhesives (Griffionen AW, 1996b; Melder RJ, 1996). Una altra limitació de les tècniques emprades fins a l'actualitat és la impossibilitat d'aportar un resultat quantitatiu que permeti establir comparacions entre l'expressió basal i estimulada de les diferents molècules d'adhesió a nivell tumoral respecte els llits vasculars no tumorals. La disponibilitat d'aquesta informació podria ajudar a entendre els mecanismes responsables de l'alteració del tràfic leucocitari a nivell tumoral.

Recentment, s'ha desenvolupat una tècnica quantitativa per a mesurar l'expressió de diferents molècules d'adhesió en diferents llits vasculars mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals marcats radioactivament (Panés J, 1995; Elizalde I, 1997; Panés J, 1998b; Sans M, 1999; Vallien G, 2000). Aquesta tècnica s'ha utilitzat per a mesurar l'expressió de P- i E-selectina (Eppihimer MJ, 1997), ICAM-1 i VCAM-1 (Henninger DD, 1997), tant en condicions basals com després d'estímuls pro-inflamatoris. Amb aquesta tècnica, Langley RR et al. van quantificar l'expressió de molècules d'adhesió en un model de tumor sòlid (Langley RR, 1999), confirmant que el teixit tumoral era capaç d'expressar les principals molècules d'adhesió implicades en el reclutament leucocitari.

3.5.4. Participació dels productes derivats del tumor en els fenòmens de reclutament leucocitari

En el procés de creixement i progressió tumoral, hi intervenen múltiples factors produïts tant pel propi hoste com per les cèl·lules tumorals. Entre aquests mediadors tumorals, els més atractius en relació a la seva potencial implicació en els fenòmens de reclutament leucocitari són l'antigen càrcino-embrionari (CEA), l'òxid nítric (NO), els productes derivats del metabolisme de la ciclooxigenasa (COX) i el factor de creixement transformant beta (TGF-β).

La concentració sèrica de CEA constitueix un dels marcadors tumorals més emprats en la valoració clínica dels pacients amb CCR pel seu valor pronòstic (Wanebo HJ, 1978; Castells A, 1998). Així, la detecció de nivells elevats s'associa a una menor supervivència. Aquesta molècula va ser descrita inicialment com una glicoproteïna onco-fetal. Estudis recents han demostrat que es tracta d'una molècula d'adhesió que pertany a la superfamília de les immunoglobulines amb importants funcions en el període d'embriogènesis i desenvolupament tumoral (Benchimol S, 1989), i potencialment implicada en el procés d'invasió tumoral (Jessup JM, 1988) i metàstasi (Hostetter RB, 1990). Les cèl·lules colòniques malignes poden expressar nivells de CEA de l'ordre de 10-100 vegades superiors respecte al teixit colònic no tumoral (Bresalier R, 1994) i amb un patró de distribució diferent. Així, mentre els colonòcits normals expressen CEA a la superfície apical, la molècula es distribueix uniformement a les cèl·lules tumorals.

La línia cel·lular HT-29 (adenocarcinoma humà colònic) presenta un grau de diferenciació moderat i posseeix capacitat per expressar CEA, una característica que s'ha emprat per a la monitorització de la resposta a diversos tractament quimioteràpics (Soletormos G, 1997; Eckert K, 1997). Estudis recents suggereixen que la producció de CEA per part de la cèl·lula tumoral pot ser un dels mecanismes d'escapament del sistema de immunovigilància. La fracció soluble de CEA inhibeix de manera dràstica i dosi-dependent l'activitat citotòxica de les cèl·lules LAK (lymphocyte activated killer) en

front de les cèl·lules colòniques tumorals (Kammerer R, 1994). Alhora, l'expressió de CEA, al igual que la de LFA-3 i ICAM-1, s'ha relacionat amb una elevada lisabilitat limfocitària (Rivoltini L, 1991). Per últim, en un estudi recent, l'administració de diferents anticossos contra les principals molècules d'adhesió (LFA-3, CD13, CD15, VLA-4, CD44v6) va bloquejar *in vitro* l'adhesió de limfòcits activats a cèl·lules de la línia HT-29 en cultiu, mentre que els anticossos monoclonals anti-CEA van estimular-la (Grüngberg E, 1998).

Totes aquestes dades suggereixen que el CEA podria jugar un paper fonamental en els fenòmens de reclutament leucocitari a nivell tumoral en el CCR. En aquest sentit, la hipòtesi de treball és que l'augment de l'expressió de CEA a nivell de la microcirculació tumoral podria ser el responsable del bloqueig funcional de les selectines en aquesta localització. Per tant, l'administració d'un anticòs bloquejant dirigit contra la molècula del CEA podria revertir l'absència d'interaccions leucòcit-endoteli a nivell de la microcirculació tumoral i restaurar els mecanismes de vigilància immunològica antitumoral.

La constatació en múltiples estudis experimentals i clínics de la existència de nivells elevats de prostaglandines en el tracte gastrointestinal i, de manera notòria, en el teixit tumoral ha despertat gran interès sobre la importància d'aquestes molècules i el seu metabolisme en els fenòmens de creixement neoplàstic (Eberhart CE, 1995). La síntesi de prostaglandines s'efectua a través de l'enzim ciclooxigenasa (COX) i, a la actualitat, existeixen evidències sòlides que recolzen la seva participació en la biologia tumoral (Taketo M, 1998; Bessa X, 2000a). Múltiples estudis han demostrat que la expressió de COX-2 es troba augmentada en pacients amb CCR i que la seva expressió s'associa amb un major potencial metastàtic (Eberhart CE, 1994; Tsuji M, 1997; Chen W-S, 2001).

COX és l'enzim responsable del metabolisme de l'àcid araquidònic i la seva conversió a prostaglandina H2, precursora dels prostanoids (PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, PGI_2

i TXA_2). Recentment, s'han descrit dues isoformes, COX-1 i COX-2, amb una homologia del 60%, i amb una afinitat i capacitat per convertir l'àcid araquidònic a PGH_2 similar (Hia T, 1992; Famaey J.P, 1997). Els principals trets diferencials entre les dues isoenzimes són la seva regulació i distribució d'expressió. La isoforma COX-1 s'expressa de manera constitutiva en pràcticament tots els teixits de l'organisme. Se li atribueix un paper regulador en l'homeostasi fisiològica dels diferents òrgans o teixits, incloent-hi la citoprotecció gàstrica, la vasodilatació a nivell renal i la producció de prostanoids proagregants i tromboxà en plaquetes (Dubois RN, 1998). Contràriament, la isoforma COX-2 és induïble, pràcticament indetectable en la majoria de teixits en condiciones basals, encara que la seva expressió pot augmentar de 10 a 80 vegades en resposta a estímuls inflamatoris, citoquines, factors de creixement i mitògens.

Diverses evidències experimentals suggereixen la participació de COX en diverses etapes de la biologia tumoral com l'activació de carcinògens químics, la proliferació cel·lular, l'apoptosis, la angiogènesis i la vigilància immunològica (Shif SJ, 1997) (Figura 7).

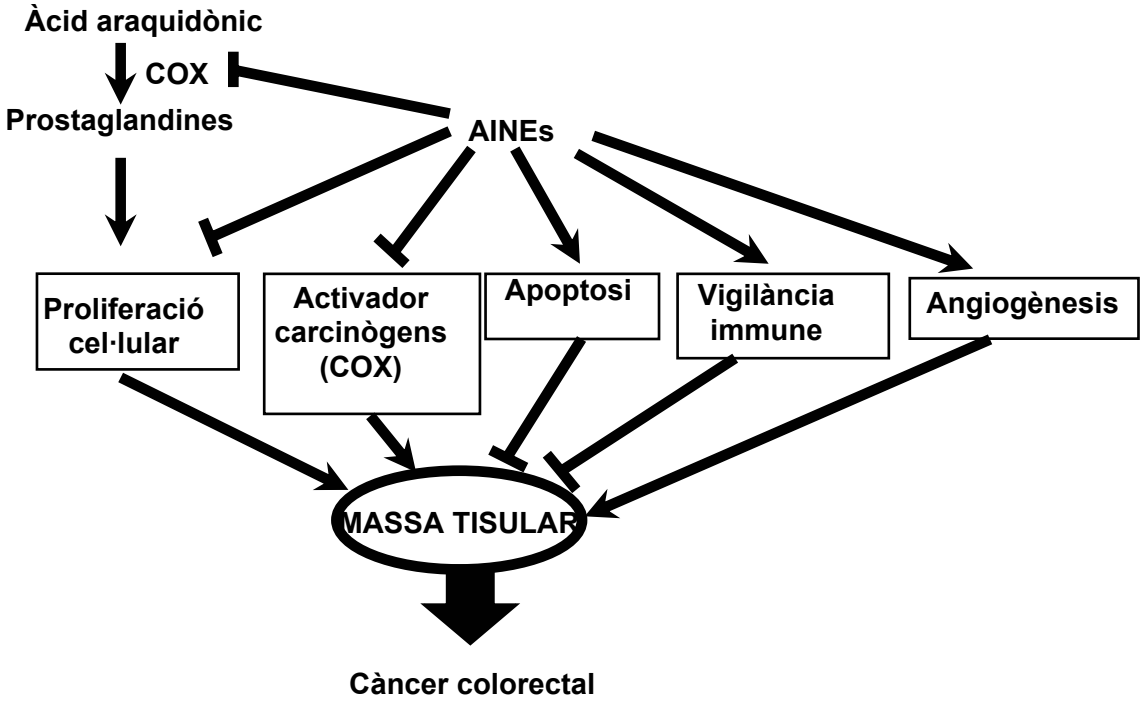

Figura 7. Esquema de la participació de ciclooxigenasa en la biologia tumoral.

La inactivació de carcinògens químics per part dels antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) es deu a la seva capacitat inhibidora d'ambdues isoformes de COX. Aquest enzim pot estimular directament la generació de substàncies com el malondialdehid, un conegut mitogen i carcinogen, o la formació de radicals peròxid, els quals poden activar a la vegada diversos procarcinògens. En aquest sentit, s'ha demostrat que carcinògens químics com els derivats dels hidrocarburs aromàtics policíclics, les amines aromàtiques i les amines heterocícliques són transformats a metabòlits mutàgens en reaccions mediades per COX-2 (Eling TE, 1990).

Els AINEs inhibeixen la divisió cel·lular i alteren les fases del cicle cel·lular en cultius de cèl·lules tumorals colòniques, afavorint la seva quiescència (Shiff SJ, 1995). Així mateix, indometacina i altres AINEs han demostrat ser potents inhibidors de la síntesi d'ADN, de l'acumulació d'adenosines cícliques, de la síntesi de factors de creixement en resposta a promotors tumorals, i de la progressió del cicle cel·lular (Hixson LJ, 1994). Una gran varietat d'AINEs, que inclou sulindac, aspirina, indometacina, naproxè i piroxicam, són capaços d'induir apoptosi en cultius cel·lulars de línies tumorals colòniques (Tsuji M, 1995;Quiao L, 1998; Agarwal B, 1999). No obstant, el mecanisme a través del qual els AINEs exerceixen aquest efecte proapoptòtic és controvertit. En aquest sentit, s'ha demostrat que l'àcid acetil salicílic i sulindac no afecten de manera apreciable l'activitat catalítica de COX, el que suggereix que aquests enzims no participen en l'apoptosi induïda pels AINEs (Piazza GA, 1995).

COX participa també a l'angiogènesi induïda per les cèl·lules carcinomatoses colòniques. El mecanisme de regulació és doble. Per una banda, la isoforma COX-2 modula la producció de factors angiogènics en les cèl·lules tumorals, mentre que, per altra, COX-1 regula l'angiogènesi a nivell de les cèl·lules endotelials (Tsujii M, 1998; Zimmermann KC, 1999).

En relació als mecanismes de defensa immunològica i el paper dels productes derivats de COX, és conegut que les molècules de la classe HLA I i II juguen un paper

preponderant en la presentació dels antígens als limfòcits T. En els teixits neoplàstics s'ha constatat un dèficit en l'expressió de molècules de la classe HLA I i II, fenomen que afavoriria l'evasió de la cèl·lula tumoral dels sistemes de vigilància immunològica. En línies cel·lulars d'adenocarcinoma colònic s'ha observat que la presència de nivells elevats de PGE_2 indueix una reducció de l'expressió de molècules HLA II (Arvind P, 1995). No obstant, els estudis sobre la participació dels mecanismes de defensa immunològica en l'efecte antitumoral dels AINEs ha ofert resultats aparentment contradictoris. Així, ha sigut possible demostrar una resposta antitumoral induïda per indometacina independent de l'estimulació de les cèl·lules *natural killer* (Cvetkovska E, 1997).

El potencial paper dels productes derivats de COX en els fenòmens de reclutament leucocitari en el CCR deriva d'estudis de microscopia intravital en altres models animals (Kurose I, 1996). En vènules mesentèriques de rates s'ha observat un augment del fenomen d'adhesió leucocitària després de l'administració d'aspirina (Asako H, 1992a) o indometacina (Asako H, 1992b), suggerint un paper cabdal dels metabòlits de COX en el reclutament leucocitari. Així doncs, donat que a nivell tumoral existeix un marcat increment de producció d'aquests productes derivats, l'administració d'inhibidors d'aquest enzim podria afavorir els fenòmens de reclutament leucocitari.

En els darrers anys, s'han aconseguit grans avenços en el coneixement de la biologia de l'òxid nítric (NO) i el seu paper clau en la fisiologia i fisiopatologia del sistema vascular (Nathan C, 1994). El NO és sintetitzat per l'enzim sintasa de l'òxid nítric (NOS) a partir del terminal guanidino de l'aminoàcid no essencial L-arginina. S'han identificat tres isoformes de NOS, dues constitutives (cNOS), presents a l'endoteli vascular (també coneguda com NOS III o eNOs) i el teixit neuronal (NOS I o nNOS), i una induïble (iNOS o NOS II), expressada a les cèl·lules del sistema immune, cèl·lules endotelials o cèl·lules musculars llises en resposta a diferents estímuls (Lowenstein, 1994). La síntesi de NO pot ésser inhibida amb l'administració exògena

d'anàlegs de la L-arginina que actuen de forma competitiva sobre les isoformes constitutives i induïbles de NOS. Els agents més habitualment emprats són L-N^G-monometil-arginina (L-NMMA) i N^G-nitro-arginina-metil ester (L-NAME), els quals són inhibidors no selectius, mentre que aminoguanidina inhibeix preferentment la forma iNOS (Misko, 1993).

NO també participa de manera molt destacada en la biologia tumoral. Així, múltiples estudis han demostrat una excessiva producció de NO en tumors sòlids (Buttery LD, 1993; Doi K, 1996; Takahashi M, 1997; Ambs S, 1998). El creixement tumoral es troba regulat per les interaccions entre les cèl·lules endotelials de la neovasculatura tumoral, les cèl·lules del sistema immune (limfòcits T i macròfags) i la pròpia cèl·lula tumoral. A tots aquests nivells, NO, ja sigui com a molècula missatgera o com citotoxina, té un paper clau. La participació de NO en el creixement tumoral és complexa i, almenys, dual (Jenkins DC, 1995). Per una banda, NO, a través del seu conegut efecte vasodilatador, afavoreix el manteniment del flux sanguini i l'aport de nutrients a nivell tumoral (Shan SQ, 1997) i, en conseqüència, afavoreix el creixement del tumor (Buttery LD 1993). Per altra banda, els nivells elevats de NO tenen efectes inhibitoris sobre la cadena respiratòria mitocondrial, el cicle de l'àcid cítric, la glicòlisi, i els mecanismes de reparació del DNA (Wink DA, 1998). Nivells elevats de ROS (*reactive oxigen species*), alliberats com a conseqüència d'interaccions amb cèl·lules del sistema immune o degut a la hipòxia tissular tumoral, poden incrementar aquests efectes inhibitoris a través de la generació de components més tòxics, com peroxinitrit (ONOO-). Tanmateix, estudis *in vitro* han demostrat la capacitat de la cèl·lula tumoral d'inhibir l'expressió de NO induïda per citoquines (Murata J, 1994).

Aquesta dualitat en l'efecte del NO sobre el creixement tumoral també es veu reflectida en el procés de disseminació metastàtica. Malgrat s'ha demostrat que NO a concentracions elevades pot ésser citotòxic, l'administració d'inhibidors de NOS ha demostrat posseir capacitat per a reduir el creixement tumoral (Orucevic A, 1996) i la

disseminació metastàtica (Yamamoto T, 1994; Yamamoto T, 1998) en diferents models experimentals.

Mentre el paper de NO a l'hemodinàmica de la microcirculació tumoral ha estat ben caracteritzat, únicament existeix un estudi que avalua el seu efecte en el reclutament leucocitari a aquest nivell (Fukumura D, 1997). Aquest estudi demostra un augment de les interaccions leucòcit-endoteli en la microcirculació tumoral després de l'administració d'un inhibidor no selectiu de NOS (L-NAME), a dosis molt elevades i amb significativa repercussió sistèmica. Amb aquests resultats, els autors especulen que la deficient interacció pot ésser deguda a un dèficit d'expressió de determinades molècules d'adhesió, i que l'administració d'un inhibidor de NO podria revertir aquest fenomen.

El factor de creixement transformant-β (TGF-β) és una superfamília de polipèptids (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) multifuncionals que controlen el creixement i la diferenciació cel·lular (Massagué J, 1990). TGF-β pot promoure l'angiogènesis i actuar, alhora, com a potent factor immunosupressor inhibint la proliferació de les cèl·lules progenitors a nivell del moll de l'os, de les línies de cèl·lules T i B, així com les seves funcions, que inclou la síntesi d'immunoglobulines, la citotoxicitat *natural killer* i la citotoxicitat de cèl·lules T (Wahl SM, 1989). A més, TGF-β és capaç d'inhibir una varietat de respostes immunes com l'habilitat proliferativa dels limfòcits T en resposta a citoquines, la generació de limfòcits citotòxics tumor-específics, l'expressió d'IFN-γ induïda per IL-12 i la secreció de TNF-α. (Tada T, 1991; Ortaldo JR, 1991;Fox FE, 1993; Lagadec P, 1996).

En estudis *in vitro* s'ha observat un augment de la transcripció del gen *TGF-β1* en línies cel·lulars de CCR (Anzano MA, 1989). Així mateix, en pacients amb aquesta neoplàsia s'ha observat un augment dels nivells de TGF-β1, el qual s'ha correlacionat amb l'estadi tumoral i el pronòstic (Tsushima H, 1996). Paral·lelament, TGF-β ha estat

també implicat en la progressió tumoral i la disseminació metastàtica en múltiples models de CCR experimental (Torre-Amine G, 1990; Welch DR, 1990; Mooradian DL, 1992; Lagadec P, 1996; Hojo M, 1999).

La participació de TGF-β1 en els fenòmens d'adhesió leucocitària ha estat establerta tant per estudis *in vitro* com en animals d'experimentació. En estudis *in vitro* s'ha observat que TGF-β1 inhibeix l'adhesió dels limfòcits T a l'endoteli tant no estimulat com després de l'administració de TNF-α i IL-1β (Gamble JR, 1988; Gamble JR, 1991). Estudis posteriors dels mateixos autors (Gamble JR, 1993) han suggerit que la inhibició de l'adhesió produïda per TGF-β era deguda a una disminució de l'expressió d'E-selectina, mentre que TGF-β no modificava l'expressió d'ICAM-1 i VCAM-1. Finalment, estudis *in vivo* en un model animal de càncer de bufeta biliar ha demostrat que TGF-β produït pel tumor disminuïa els fenòmens d'interacció leucòcit-endoteli, fenomen que revertia amb l'administració d'un anticòs monoclonal contra TGF-β (Gohongi T, 1999).

3.6. Detecció i importància clínica de la malaltia mínima residual

El pronòstic dels pacients en els que no hi ha evidència clínica de metàstasi està determinat per diverses característiques pròpies del tumor primari (mida, profunditat de l'afectació, afectació ganglionar, etc.) (Beahrs OH,1993). En base a aquests paràmetres és possible fer una estimació de la probabilitat de recurrència i de supervivència, la qual cosa permet establir la conveniència d'efectuar algun tractament complementari a la cirurgia per tal de minimitzar el risc de disseminació metastàtica. Tanmateix, aquests paràmetres no són suficientment acurats per a predir el pronòstic d'un determinat malalt de manera individualitzada.

De l'esmentat prèviament se'n deriva la necessitat d'identificar nous indicadors pronòstic amb una major capacitat predictora. Una d'aquestes aproximacions contempla la determinació de la manifestació més precoç del procés de disseminació tumoral, la malaltia mínima residual. Aquest concepte inclou tant la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants com la detecció de micrometàstasis a nivell de ganglis limfàtics o en el moll de l'ós. La detecció de malaltia mínima residual ha suposat un pas cabdal en la recerca oncològica ja que la disseminació precoç de la cèl·lula tumoral és el principal responsable de la recidiva a distancia.

La presència de metàstasis en els ganglis limfàtics regionals és un dels principals factors de risc en els pacients amb neoplàsies sòlides quan no existeix evidència de metàstasi a distància. No obstant, l'examen histològic simple pot infraestimar l'afectació neoplàstica real a aquest nivell (Gusterson B, 1990). Per tal d'incrementar el rendiment diagnòstic de histologia convencional, s'han emprat tècniques immunohistoquímiques. Aquesta aproximació ha permès la detecció de cèl·lules neoplàstiques a nivell dels gànglis limfàtics regionals i en el moll de l'ós en diverses neoplàsies (Pantel K, 1996; Jauch KW, 1996; Braun S, 2000), entre elles el CCR (Lindeman F, 1992; O'Sullivan GC, 1995; O'Sullivan GC, 1997). A més, ha sigut possible demostrar que la seva detecció té implicacions pronòstiques evidents, ja que

la seva presència empobreix el pronòstic d'aquests pacients (Hayashi N,1995; Liefers GJ, 1998).

Independentment de la detecció de micrometàstasis a nivell ganglionar i en el moll de l'ós, en els darrers anys ha existit un creixent interès en la detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb neoplàsies sòlides, com a marcador de disseminació precoç del tumor. Una de les primeres tècniques emprades per a la seva detecció va ésser la tinció citoquímica d'una extensió de sang perifèrica (Pool EH, 1994). Aquesta tècnica posseïa una sensibilitat d'una cèl·lula tumoral en 10^2 cèl·lules no tumorals. Posteriorment, es van desenvolupar tècniques immuno-citoquímiques que permetien la detecció d'una cèl·lula tumoral en 10^5 cèl·lules no tumorals (Osborne M, 1991; Leather AJM,1993). Finalment, un altre mètode desenvolupat ha estat la utilització de tècniques de citometria de flux després d'un marcatge immunohistoquímic fluorescent (Gross H,1995).

Tanmateix, no ha estat fins el desenvolupament de tècniques de biologia molecular basades en l'amplificació dels àcids nucleics amb ajuda de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que s'ha donat un pas definitiu en la detecció de la malaltia mínima residual, ja siguin micrometàstasis o cèl·lules neoplàstiques circulants. Aquestes tècniques han permès una sensibilitat d'una cèl·lula tumoral en 10^7 cèl·lules no tumorals (Pantel K, 1996; Zippelius A, 1997). Amb aquestes tècniques ha estat possible detectar micrometàstasis a nivell de ganglis limfàtics o del moll de l'os en pacients amb melanoma (Ghossein RA, 1998), càncer de pròstata (Wood DP, 1997), càncer de mama (Noguchi S, 1996) i CCR (Gerhard M, 1994; Hayashi N, 1995; Soeth E, 1996; Liefers GJ, 1998). A més, la detecció de micrometàstasi s'ha correlacionat amb el pronòstic a llarg termini, amb la qual cosa aquestes tècniques poden ésser d'utilitat en el seguiment i tractament d'aquests pacients.

Per tal d'establir la importància real de la detecció de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica és necessari tenir en compte les característiques del procés de disseminació metastàtica. Aquest és un procés complexe, multifactorial i summament

ineficient, en el que la circulació de cèl·lules tumorals en el torrent circulatori és un pas necessari però no suficient per al desenvolupament final de metàstasis (Liotta LA, 1991). Evidències experimentals indiquen que menys del 0,01% de les cèl·lules tumorals que entren a la circulació sanguínia sobreviuen un temps suficient per a donar lloc a un focus metastàsic. D'altra banda, el despreniment cel·lular a nivell del tumor primari és un fenomen intermitent i, per altra, les cèl·lules sovint circulen agrupades (Liotta LA, 1991; Molnar B, 2001), el que dificulta la seva detecció en una determinació de sang perifèrica aïllada.

Múltiples estudis han demostrat la reproductibilitat i aplicabilitat de la detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb diferents neoplàsies (Smith B, 1991; Moreno JG, 1992; Tada M, 1993; Hillaire JE, 1994; Johnson PWH, 1995; Funaki NO, 1998a), incloent el CCR (Hardingham JE, 1995; Burchill SA, 1995; Wong LS, 1995; Jonas S, 1996; Denis MG, 1997; Nakamori S, 1997; Soeth E, 1997; Wyld DK, 1998; Funaki NO, 1998b). Tanmateix, és important destacar que a la major part d'aquests estudis no existeix un grup control ampli (Denis MG, 1997; Nakamori S, 1997; Wong LS, 1997) o només s'han inclòs pacients amb malaltia metastàtica (Jonas et al., 1996), el que impedeix establir apropiadament la seva rendibilitat.

La rellevança clínica de la detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants ha estat ben establerta en pacients amb melanoma (Mellado B, 1996) i càncer de pròstata (Ghossein RA, 1997), en els que la seva detecció s'associa a un pitjor pronòstic a llarg termini. Contràriament, el potencial valor pronòstic d'aquest fenomen en pacients amb CCR ha estat insuficientment estudiat, el que ha ocasionat resultats sovint contradictoris. Mentre un estudi emprant com a marcador de cèl·lula tumoral la detecció de citoqueratina 20 (CK-20) no va confirmar cap relació amb la progressió o supervivència (Wyld DK, 1998), altres estudis han aportat resultats contraris. Yamaguchi *et al.* (Yamaguchi K, 1999), en pacients amb CCR operats amb presumpció curativa, va demostrar que únicament la detecció de cèl·lules neoplàstiques a sang provinent de les venes de drenatge tumoral s'associava amb una

reducció significativa de la supervivència global. Així mateix, Soeth *et al.* (Soeth E, 1997) van confirmar el valor pronòstic de la detecció de micrometàstasi al moll de l'ós, ja que els pacients amb determinació positiva de CK-20 a sang perifèrica i a la medul·la, o únicament a aquest darrer territori tenien una supervivència inferior en relació als individus amb determinació negativa a ambdues mostres. No obstant, aquest estudi no va aportar dades referents exclusivament a la detecció a sang perifèrica, fet que no permet extreure conclusions definitives. Amb una aproximació metodològica diferent, basada en la detecció de mutacions del gen *KRAS* mitjançant tècniques de *immunobead*-PCR, Hardingham *et al.* van suggerir que la seva presència s'associa a una disminució de la probabilitat de supervivència lliure de malaltia en pacients amb CCR operats amb finalitat radical (Hardingham JE, 1995).

Tres estudis han suggerit el valor pronòstic de la detecció selectiva de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica mitjançant tècniques de RT-PCR en pacients amb CCR. Funaki *et al.* (Funaki NO, 1998b) van suggerir que la detecció a sang perifèrica de ARNm per a CK-20 podia ésser útil com a marcador de recurrència tumoral. No obstant, l'anàlisi es va efectuar en un grup reduït de pacients, amb un seguiment escàs, i únicament es va avaluar la recidiva locoregional, on aparentment la mobilització tumoral no té un paper rellevant. Taniguchi *et al.* (Taniguchi T, 2000), en un grup de pacients seguits durant 9-30 mesos, va concloure que la supervivència lliure de malaltia en pacients amb determinació negativa de ARNm per a CEA a les venes de drenatge tumoral o a sang perifèrica era significativament superior que en els pacients amb una determinació positiva a qualsevol de les dues mostres. Més recentment, Fujita *et al.* (Fujita S, 2001) no ha observat cap relació entre la presència de cèl·lules tumorals a sang perifèrica i l'estadi tumoral, emprant tècniques de RT-PCR per a CK-19 i CK-20. No obstant, sí que va observar un impacte negatiu en la supervivència dels pacients amb determinació positiva. De nou, el nombre reduït de malalts inclosos, l'escàs temps de seguiment i la manca d'ajustament dels resultats en

base a l'estadi tumoral no permet extreure'n conclusions definitives de la rellevança clínica d'aquest fenomen.

Independentment del valor pronòstic de la detecció basal de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica, diversos estudis que avaluen longitudinalment la seva presència abans i després de la cirurgia, indiquen que la cirurgia pot afavorir el despreniment i la mobilització cel·lular (Weitz J, 1998; Weitz J, 1998; Hayashi N, 1999; Sales JP, 1999) al mateix temps que ocasionar un aclariment d'aquestes cèl·lules a nivell perifèric (Patel H, 2002). Aquestes dades suggereixen que la detecció postoperatòria de cèl·lules neoplàstiques circulants pot reflectir la persistència de malaltia neoplàstica residual i, per tant, associar-se a un pitjor pronòstic a llarg termini.

4. PUBLICACIONS ORIGINALS

5. DISCUSSIÓ

La Tesi Doctoral "Interacció leucòcit-endoteli i mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el càncer colorectal" ha pretès aprofundir en el coneixement dels mecanismes que participen en el creixement, progressió tumoral i disseminació metastàtica. A la primera part d'aquest projecte, mitjançant un estudi experimental, s'ha caracteritzat la interacció leucòcit-endoteli i els seus determinants moleculars, un fenomen clau en el procés de vigilància immunològica davant les cèl·lules neoplàstiques. Seguint la seqüència pròpia de la disseminació metastàtica, la segona part del projecte ha avaluat la rellevància de detecció de cèl·lules tumorals circulants com a marcador de malaltia mínima neoplàstica.

El procés de creixement i progressió tumoral depèn de l'equilibri existent entre factors que l'estimulen i els que intenten evitar-lo. Entre aquests darrers destaca el sistema immunovigilància de l'hoste (Ferrara N, 1991), el qual pretén reconèixer i destruir les cèl·lules neoplàstiques. La importància de la immunovigilància ha quedat reflectida en diversos estudis experimentals, els quals demostren el seu potencial antitumoral (Yu WG, 1997). El desenvolupament de les tècniques de microscopia intravital ha suposat una nova aproximació a l'estudi dels fenòmens d'interacció leucòcit-endoteli, en els fenòmens de creixement tumoral (Ning Z, 1992; Fukumara D, 1995; Borgström P, 1997), de manera similar a com s'ha fet en altres situacions com la malaltia inflamatòria intestinal (Sans M, 1999) o la infecció per *Helicobacter pylori* (Elizalde I, 1997).

En el primer estudi d'aquesta Tesi Doctoral, els fenòmens d'interacció leucòcit-endoteli es van estudiar en un model heterotòpic de CCR. Aquest model permet el creixement tridimensional del teixit tumoral, reproduint amb gran fiabilitat les condicions de creixement i expansió habituals en un tumor sòlid, a diferència del que passa amb els models clàssics (*dorsal skinfold chamber*). A més, presenta les característiques habituals en relació als vasos tumorals, com són la tortuositat vascular

i la presència de comunicacions artèrio-venoses, el que es coneix com *chaotic microvessels network*. La clara distinció entre la microvasculatura normal i la tumoral facilita la comparació simultània d'ambdós territoris vasculars. Per últim, una avantatge addicional d'aquest model respecte als que utilitzen la *dorsal skinfold chamber* és que no s'incorporen materials extracorporis evitant possibles efectes sobre el creixement i la microcirculació tumoral (Lehr HA, 1993).

La interacció leucòcit-endoteli havia estat parcialment caracteritzada en diversos models experimentals que indicaven una deficient interacció a nivell tumoral. En un d'aquests estudis, on es va aprofundir en els mecanismes de reclutament leucocitari, l'estimulació amb limfotoxina va induir un ràpid increment en els fenòmens de rodament dependent de P- i E-selectina. La posterior perfussió amb leucotriè β_4 va produir una adhesió leucocitària ferma, dependent de β_2 integrina (Borgström P, 1997). Aquests resultats suggerien que la deficient interacció leucòcit endoteli era produïda per la incapacitat del teixit tumoral d'expressar les diferents molècules d'adhesió endotelial implicades en aquest fenomen, però aquesta hipòtesis no havia estat avaluada.

En el nostre model experimental, en primer lloc, es va caracteritzar i estudiar els fenòmens de interacció leucòcit-endoteli a la microcirculació tumoral. Així, es va confirmar que a nivell tumoral existeix una deficient interacció leucòcit-endoteli, tant pel que fa al rodament en condicions basals com a l'adhesió leucocitària post-administració d'un estímul pro-inflamatori, respecte a la vasculatura no tumoral. Els determinants moleculars dels fenòmens de rodament leucocitari només van poder ser estudiats a nivell de la microcirculació no tumoral, ja que a nivell de la microcirculació del tumor aquests eren pràcticament inexistents. A nivell de la microcirculació no tumoral, aquests fenòmens eren dependents de P- i L-selectina, ja que el seu immunobloqueig va reduir-los significativament. Contràriament, l'administració d'anticossos contra E-selectina no va produir cap efecte. En condicions basals, els fenòmens d'adhesió leucocitària tant a nivell de la microcirculació tumoral com no

tumoral eren pràcticament inexistents. No obstant, l'administració de lipopolisacàrid, un conegut agent pro-inflamatori, va produir un increment significatiu dels fenòmens d'adhesió a ambdós territoris. Novament, aquesta adhesió leucocitària era significativament inferior a nivell de la microcirculació tumoral respecte al vasos no tumorals. En el mateix model, es va confirmar que aquesta deficient interacció leucòcit-endoteli (rodament i adhesió) no podia ser explicada per canvis en les forces de dispersió (*shear stress*) a nivell de la microcirculació tumoral, ja que les característiques hemodinàmiques a aquest nivell teòricament haurien d'afavorir aquests fenòmens. A través d'estudis d'immunobloqueig amb anticossos monoclonals específics, es va demostrar que l'adhesió leucocitària tant a nivell de la microcirculació tumoral com no tumoral era dependent d'ICAM-1. L'immunobloqueig amb anti-ICAM-1 va abolir l'adhesió i va restaurar els fenòmens de rodament mentre anti-VCAM-1 no va produir cap efecte sobre els fenòmens d'adhesió i rodament leucocitari.

Un cop confirmada la deficient interacció leucòcit-endoteli a nivell de la microcirculació tumoral es va investigar si aquesta era deguda a una deficient expressió de molècules d'adhesió, tal i com s'havia suggerit. Com s'ha esmentat a la introducció, fins a l'actualitat, la quantificació de molècules d'adhesió s'havia basat en mètodes immunohistoquímics, observant-se resultats heterogenis i freqüentment contradictoris (Nelson H, 1994; Ye C, 1995; Piali L, 1995; Griffionen AW, 1996a; Hellwig S, 1997; Maurer CA, 1998). En el nostre estudi, l'expressió de les molècules d'adhesió es va avaluar mitjançant una tècnica de recent introducció basada en la utilització d'anticossos monoclonals contra les diferents molècules d'adhesió (Panés J, 1995). Aquesta tècnica s'ha demostrat eficaç en la quantificació de molècules d'adhesió en diferents territoris vasculars (Panés J, 1998b), incloent la neovasculatura tumoral (Langley RR, 1999). Així, en condicions basals, E-selectina no s'expressava en cap dels territoris avaluats (tumoral i no tumoral). Per contra, P-selectina presentava una major expressió en condicions basals a nivell del teixit tumoral. A més, després de l'administració de lipopolisacàrid, tant E- com P-selectina presentaven una

major expressió a nivell de la microcirculació tumoral. Per tant, aquests resultats indicaven que el deficient rodament a nivell de la microcirculació tumoral no podia ser explicat per una deficient expressió de les molècules d'adhesió endotelials que hi participen (E- i P-selectina). En relació a l'expressió de les molècules d'adhesió endotelials implicades en els fenòmens d'adhesió leucocitària, ICAM-1 presentava una expressió equivalent tant a nivell de la microcirculació tumoral com no tumoral, ja sigui en condicions basals com post-administració de lipopolisacàrid. Contràriament, l'expressió de VCAM-1 va ser inferior a nivell de la microcirculació tumoral, tant en condicions basals com post-administració de lipopolisacàrid, però la magnitud del increment després de l'administració de l'estímul pro-inflamatori va ser similar en ambdós territoris. Malgrat tot, dues observacions suggerien que aquesta menor expressió de VCAM-1 no era la responsable de la menor interacció a nivell tumoral. En primer lloc, l'augment de l'expressió de VCAM-1 induïda per lipopolisacàrid a nivell de la microcirculació tumoral no s'acompanyava d'un augment de l'adhesió leucocitària paral·lel a l'observat a la microcirculació no tumoral. En segon lloc, més important, la immunoneutralització amb VCAM-1 no tenia cap efecte sobre els fenòmens de reclutament leucocitari a nivell de la microcirculació tumoral. Per tant, com a conclusió d'aquesta segona part de l'estudi es podia afirmar que, en aquest model experimental, la deficient interacció leucòcit-endoteli a nivell de la microcirculació tumoral no podia ser explicada per una deficient expressió de les diferents molècules d'adhesió endotelial.

Els resultats obtinguts suggerien que havia d'existir un mecanisme alternatiu responsable del deficient reclutament leucocitari. Una possibilitat era que les pròpies cèl·lules tumorals podien ser capaçes de produir substàncies que interferissin en aquests fenòmens. Entre aquestes, es van identificar un grup de productes amb un major potencial en funció d'evidències indirectes de la seva participació en el creixement tumoral i/o en el reclutament leucocitari: l'antigen càrcino-embrionari (CEA) (Rivoltini L, 1991; Kammerer R, 1994), els productes derivats de la ciclooxigenasa

(COX) (Asako H, 1992a i 1992b; Taketo M, 1998), l'òxid nítric (NO) (Jenkins DC, 1995; Fukumara D, 1997) i el factor de creixement transformant beta (TGF-β1) (Lagadec P, 1996; Hojo M, 1999).

Malgrat estudis experimentals *in vitro* havien demostrat que l'immunobloqueig del CEA afavoria els fenòmens d'adhesió limfocitària en línies cel·lulars HT-29 (Grünberg E, 1998), en el nostre model l'administració d'un anticòs contra el CEA va produir un augment no selectiu dels fenòmens de rodament leucocitari tant a la microcirculació tumoral com no tumoral, el que permetia descartar la participació d'aquesta molècula. L'administració d'inhibidors no selectius i selectius de COX (indometacina i sc-236, respectivament) no va induir cap canvi en els fenòmens de rodament leucocitari a nivell de la microcirculació tumoral. Tanmateix, malgrat el nul efecte de l'administració d'una inhibidor selectiu de la isoforma induïble de COX (COX-2), no es pot descartar d'una manera definitiva la participació d'aquesta molècula ja que l'expressió de la proteïna COX-2 a la línia cel·lular HT-29 és molt baixa (Shao J, 2000; Hsi LC, 2000),.

L'administració d'un inhibidor selectiu de la isoforma induïble de la sintasa de l'òxid nítric (iNOS) no va produir cap efecte sobre els fenòmens de reclutament leucocitari a nivell de la microcirculació tumoral. Contràriament, el bloqueig no selectiu de la síntesi de NO va produir un increment dosi-depenent dels fenòmens de rodament leucocitari a ambdós territoris (tumoral i no tumoral). Així mateix, l'administració combinada de lipopolisacàrid i l'inhibidor no selectiu va produir un augment de l'adhesió a la microcirculació tumoral, sense incrementar els fenòmens d'adhesió leucocitària induïts per l'administració aïllada de lipopolisacàrid a la vasculatura no tumoral. Per tant, aquests resultats indicaven que NO produït per la isoforma constitutiva de la sintasa de l'òxid nítric (cNOS) podia ésser un dels mediadors implicats en la deficient interacció leucòcit-endoteli en aquest model experimental de CCR.

Evidències prèvies en estudis *in vitro* (Gamble JR 1991 i 1993) i *in vivo* (Gohongi T, 1999) suggerien la participació de TGF-β1 en els fenòmens de reclutament leucocitari en diferents models tumorals experimentals. En el present estudi, l'immunobloqueig selectiu de TGF-β1 revertia de manera parcial, però selectivament a nivell de la microcirculació tumoral, el deficient reclutament leucocitari, tant el rodament com l'adhesió post-administració d'un estímul pro-imflamatori. Per tant, els resultats observats demostraven que TGF-β1 era un altre dels factors implicats en els fenòmens d'escapament dels sistemes de vigilància immunològica.

Globalment, els resultats obtinguts en aquest estudi obren un nou camí en el coneixement dels sistemes de vigilància immunològica, i podrien afavorir el desenvolupament de noves estratègies de control del creixement tumoral basades en la potenciació de la interacció de les cèl·lules del sistema immune amb l'endoteli tumoral.

A la segona part de la Tesi Doctoral s'ha avaluat la possibilitat d'identificar la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb CCR, per tal de conèixer la seva potencial utilitat clínica i pronòstica. La importància de la detecció en sang perifèrica de cèl·lules neoplàstiques circulants ve determinada per el fet que és un dels factors claus en el procés de disseminació metastàtica (Liota LA,1991). Així, mentre la significació pronòstica de la malaltia residual a nivell dels ganglis limfàtics o el moll de l'os està ben establerta (Gerhard M, 1994; Hayashi N, 1995; Soeth E, 1996; Liefers GJ, 1998), no es coneix el valor predictiu de la presència de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica o portal en pacients amb CCR.

En el segon estudi d'aquest Tesi Doctoral es va confirmar que era possible identificar l'ARN missatger (ARNm) pel CEA mitjançant tècniques de retrotranscripció i posterior amplificació a través de la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a sang perifèrica de pacients amb CCR. Aquesta tècnica permetia identificar amb una gran sensibilitat (una cèl·lula per cada 10^7 leucòcits) i especificitat (no es va identificar

cap transcrit en les mostres control) la presència de cèl·lules epitelials circulants. En base a les següents evidències es va assumir que la presència d'ARNm pel CEA a sang perifèrica identificava la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants. En primer lloc, la detecció d'ARNm pel CEA es correlacionava amb l'estadi tumoral. En segon lloc, la seva presencia també es correlacionava amb els nivells sèrics de CEA en aquests pacients. Finalment, la no detecció d'ARNm pel CEA en els individus del grup control indicava l'elevada especificitat de la tècnica. Tanmateix, els resultats obtinguts en pacients afectes d'una malaltia inflamatòria intestinal, en els que també es va detectar ARNm pel CEA a sang suggeria que aquest mètode detectava alhora cèl·lules epitelials colòniques no neoplàstiques.

Emprant la tècnica descrita, en el tercer estudi de la present Tesi Doctoral, es va avaluar un dels fenòmens més controvertits de la cirurgia laparoscòpica en el tractament del CCR. Estudis experimentals (Bouvy ND, 1997; Watson RW, 1998) i clínics (Berends FJ, 1994; Vukasin P, 1996) havien suggerit que les condicions tècniques pròpies de la cirurgia laparoscòpica podien afavorir la disseminació a distància. Així, les dades obtingudes en el tercer estudi van confirmar que la manipulació quirúrgica pot afavorir la mobilització de les cèl·lules tumorals, però que aquesta no estava influenciada per la tècnica quirúrgica emprada (laparoscòpica o oberta). L'efecte de la cirurgia sobre la mobilització cel·lular es va avaluar tant a nivell sistèmic com portal, no observant diferències entre la cirurgia laparoscòpica i la convencional. Per altra banda, un altre aspecte controvertit de la cirurgia laparoscòpica és el seu potencial efecte afavoridor de l'aparició de metàstasi en els punts d'inserció dels tròcars (*port-site metastases*) (Wexner S, 1995; Kim SH, 1998). Per tal d'avaluar aquesta possibilitat, es van obtenir mostres de líquid peritoneal abans i després de la cirurgia. Els resultat obtinguts van permetre establir que la disseminació peritoneal durant la cirurgia és un fenomen infreqüent, i novament, no determinat per l'aproximació quirúrgica emprada, cirurgia laparoscòpica o convencional.

La detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants com marcador de malaltia residual en pacients amb CCR hauria de permetre establir, de manera individualitzada, el risc d'un determinat pacient per desenvolupar disseminació tumoral. Aquesta possibilitat permetria optimitzar les estratègies de tractament i seguiment, amb la conseqüent reducció d'efectes indesitjables i estalvi de recursos. Com s'ha esmentat prèviament, però, fins a l'actualitat aquest potencial valor pronòstic no havia estat adequadament avaluat, ja que hi havia pocs estudis, amb un nombre reduït de pacients, la majoria amb malaltia disseminada en el moment de la inclusió, i amb un seguiment curt (Funaki NO, 1998b; Taniguchi T, 2000; Fujita S, 2001). En aquest sentit, el quart estudi d'aquesta Tesi Doctoral, on s'ha analitzat el significat pronòstic de la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants en pacients amb CCR, constitueix la sèrie publicada més amplia i amb un major temps de seguiment. Es van incloure un grup molt ampli de pacients que englobava tots els estadis tumorals i, més important, un subgrup de pacients que havien estat sotmesos a cirurgia amb pretensió curativa. Lamentablement, l'anàlisi de riscos proporcionals de COX va confirmar que la detecció preoperatòria de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica mitjançant tècniques de RT-PCR contra l'ARNm del CEA no tenia valor pronòstic en pacients amb CCR. Així, la detecció de cèl·lules circulants no es va correlacionar ni amb la probabilitat de recurrència ni amb la supervivència global o relacionada amb el càncer. Aquesta manca de correlació es va mantenir un cop efectuat l'ajustament en funció del estadi tumoral dels pacients.

Per altra banda, malgrat haver demostrat la manca de valor pronòstic de la presència de cèl·lules neoplàstiques circulants preoperatòriament, el fet que la manipulació tumoral durant la cirurgia afavoreixi la mobilització cel·lular tumoral (Weitz J, 1998; Hayashi N, 1999; Sales JP, 1999) va obligar a avaluar la potencial capacitat predictiva de la detecció de cèl·lules neoplàstiques després de la intervenció. De nou, emprant la mateixa metodologia que a l'estudi previ, en el cinquè treball d'aquesta Tesi Doctoral es va confirmar que la detecció a les 24 hores de la cirurgia de cèl·lules

neoplàstiques circulants no presentava valor pronòstic en pacients amb CCR operats amb finalitat radical. Així, la seva detecció no es va correlacionar ni amb la probabilitat de recurrència ni amb la supervivència global o relacionada amb el càncer. De manera similar, tampoc es va observar correlació pronòstica en els pacients amb determinació basal negativa i positiva a les 24 hores de la intervenció quirúrgica.

A l'hora d'aprofundir en els motius que poden justificar la manca de valor pronòstic de la detecció de cèl·lules neoplàstiques a sang perifèrica, cal tenir en compte diferents consideracions. En primer lloc, la utilització de diferents marcadors en els diferents estudis publicats (CEA, guanyl ciclase C, citoqueratines 18, 19 i 20, entre d'altres) reflecteix la manca d'un marcador selectiu i específic de la cèl·lula tumoral neoplàstica d'origen colònic (Zippelies A, 1997; Pantel K, 1999). En segon lloc, la disseminació tumoral no és un procés continu, sinó intermitent, alhora que les cèl·lules acostumen a circular formant agregats (Liota LA, 1991), dues circumstàncies que fan que una determinació aïllada probablement no sigui del tot representativa de l'existència o no d'aquestes cèl·lules a sang perifèrica. En aquest sentit, la utilització combinada de diferents marcadors i l'obtenció de mostres en diferents moments podria permetre millorar aquesta metodologia. Altres estratègies podrien basar-se en la detecció de mutacions o canvis genètics específics a nivell d'ADN, estratègia que ha resultat exitosa en pacients amb càncer de pulmó (Chen X, 1996), cap i coll (Nawroz H, 1996) o pàncreas (Castells A, 1999)

6. CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en els diferents estudis experimentals i clínics de la Tesi Doctoral "Interacció leucòcit-endoteli i mobilització de cèl·lules neoplàstiques en el càncer colorectal" permeten extreuren les següents conclusions:

- En el càncer colorectal experimental existeix una disminució de la interacció leucòcit-endoteli (rodament i adhesió ferma) a nivell dels vasos tumorals neoformats respecte als vasos no tumorals, tant en condicions basals com després de l'administració d'un estímul pro-inflamatori.
- Aquest dèficit en el reclutament leucocitari a nivell dels vasos neoformats no es pot atribuir a diferències en les forces de dispersió a nivell de la microcirculació tumoral.
- L'immunobloqueig d'ICAM-1 evita els fenòmens d'adhesió leucocitària a nivell dels vasos tumorals neoformats, confirmant el paper clau d'aquest molècula en l'adhesió mediada per un estímul inflamatori.
- VCAM-1 no participa en els fenòmens d'adhesió leucocitària induïda per estímuls inflamatoris ja que el seu immunobloqueig no modifica els resultats.
- La disminució dels fenòmens de rodament i adhesió leucocitària en els vasos tumorals no es pot atribuir a una deficient expressió de selectines endotelials (P- i E-selectines) ni d'immunoglobulines específiques (ICAM-1 i VCAM-1), respectivament.
- L'antigen càrcino-embrionari soluble i els productes derivats de ciclooxigenasa no participen en la deficient interacció leucòcit-endoteli a nivell de la microcirculació tumoral.

- L'òxid nítric produït per la sintasa constitutiva atenua el rodament leucocitari a nivell de la microcirculació tumoral i no tumoral, així com l'adhesió després d'un estímul pro-inflamatori de manera selectiva a nivell de la microcirculació tumoral, el que suggereix que és un dels factors responsables de l'escapament de la cèl·lula tumoral dels sistema d'immunovigilància.
- TGF-β1 atenua, al menys en part, els fenòmens de rodament i d'adhesió leucocitària a nivell de la microcirculació tumoral, el que suggereix que és un dels factors responsables de l'escapament de la cèl·lula tumoral dels sistema d'immunovigilància.
- Mitjançant tècniques de retrotranscripció i amplificació amb la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) és possible detectar l'ARN missatger per l'antigen càrcino-embrionari a sang perifèrica de pacients amb càncer colorectal. La seva detecció és indicativa de la presència de cèl·lules epitelials d'origen colònic, de probable origen tumoral en els malalts amb càncer colorectal.
- La detecció d'ARN missatger per l'antigen càrcino-embrionari a sang perifèrica es correlaciona amb la presència de metàstasis a distància.
- La manipulació tumoral durant l'acte quirúrgic afavoreix la mobilització de cèl·lules neoplàstiques en pacients amb càncer colorectal.
- La mobilització de cèl·lules neoplàstiques circulants no depèn de l'aproximació quirúrgica emprada (cirurgia oberta *versus* laparoscòpica).
- La disseminació tumoral a nivell peritoneal durant la cirurgia és extremadament infreqüent, i de nou, no depèn de la tècnica quirúrgica utilitzada (cirurgia oberta *versus* laparoscòpica).
- La detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants abans de la cirurgia no té implicacions pronòstiques en els pacients amb càncer colorectal.

- La detecció de cèl·lules neoplàstiques circulants a les 24 hores d'una cirurgia amb finalitat curativa no té implicacions pronòstiques en pacients amb càncer colorectal.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzaian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. N Engl J Med 1998;338:1481-1487.
- Agarwal B, Rao CV, Bhendwal S, Ramey WR, Shirin H, Reddy BS, Holt PR. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. Gastroenterology 1999;117:838-847.
- Allendorf JD, Bessler M, Kayton ML, Oesterling SD, Treat MR, Nowygrod R, Wheland RL. Increased tumor stablisment and growth after laparotomy vs laparoscopy in a murine model. Arch Surg 1995;130:649-653.
- Ambs S, Merriam WG, Bennet WP, Felley-Bosco E, Ogonfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG, Billiar TR, Harris C. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. Cancer Res 1998;58:334-341.
- American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. Gastroenterology 2001; 121:195-197.
- Anzano MA, Rieman D, Prichett W, Bowen-Pope DF, Greig R. Grwth factor production by human colon carcinoma cell lines. Cancer Res 1989;49:2898-2904.
- Arvind P, Papavassiliou ED, Tsioulias GJ, Qiao L, Lovelace CIP, Rigas B. PGE2 down-regulates the expression of HLA-DR antigen in human colon adenocarcinoma cell lines. Biochemistry 1995;34:5604-5609.
- Asako H, Kubes P, Wallace J, Gaginella T, Wolf RE, Granger DN. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules : role of lipooxigenase products. Am J Physiol 1992b;262:G903-G908.

- Asako H, Kubes P, Wallace J, Wolf RE, Granger DN. Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. Gastroenterology 1992a;103:146-152.
- Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ. Manual for staging of cancer, 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott 1993.
- Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule.Cell 1989;57:327-334.
- Berends FJ, Kazemier G, Bonjer HJ, Lange JF. Subcutaneous metastases after laparoscopic colectomy. Lancet 1994; 344:58.
- Berger R., Albelda S.M., Berd D., Loffreda M., Whitaker D., Murphy G.F. Expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) during melanoma angiogenesis in vivo. J Cutan Pathol 1993;20:399-406.
- Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Adrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. α4 integrins mediate lymphocyte attachment and roling under physiologic flow. Cell 1995;80:413-422.
- Bessa X, Piñol V, Elizalde JI, Castells A. Angiogénesis y Cáncer. 2000. Timely Topics in Medicine-Enfermedades del tracto digestivo superior (www.prous.es/ttm).
- Bessa X, Piñol V, Elizalde JI, Castells A. Ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el cáncer digestivo. Implicaciones terapéuticas. Gastroenterol Hepatol 2000a;23:483-490.
- Boland CR, Sinicrope FA, Brenner DE, Carethers JM. Colorectal cancer prevention and treatment. Gastroenterology 2000;118:S115-S128.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res 1998;58:5248-5257.

- Borgström P, Hughes GK, Hansell P, Wolitzky BA, Sriramarao P: Leukocyte adhesion in angiogenic blood vessels. Role of E-selectin, P-selectin, and β2 integrin in lymphotoxin-mediated leukocyte recruitment in tumor microvessels. J Clin Invest 1997;99:2246-2253.
- Bouvy ND, Marquet RL, Jeckel J, Bonjer HJ. Laparoscopic surgery is associated with less tumor growth stimulation than conventional surgery: an experimental study. Br J Surg 1997;84:358-61.
- Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CRM, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. N Engl J Med 2000;342:525-533.
- Bresalier R. Molecules adhesion in cancer. Gastroenterology 1994;106:1378-1382.
- Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, George WD. Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction. Surgery 1995;117:96-101.
- Buchmann P, Christen D, Moll C, Flury R, Sartoretti C. Tumor cells in the peritoneal irrigation fluid in conventional and laparoscopic surgery for colorectal carcinoma. Swiss Surg 1996;4:S45-S49.
- Bülow C, Vasen HFA, Järvinen H, Bjork J, Bisgaard ML, Bulow S. Ileorectal anastomosis is appropriate for a subset of patients with familial adenomatous polyposis. Gastroenterology 2000; 119:1454-1460.
- Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Br J Cancer 1995;71:278-281.
- Burt RW. Colon cancer screening. Gastroenterology 2000;119:837-853.

- Buttery LD, Springall DR, Andrade SP, Riveros-Moreno V, Hart I, Piper PJ, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumours in mice. J Pathol 1993;171:311-319.
- Campo E, Monteagudo C, Castronovo V, Claysmith AP, Fernandez PL, Sobel ME. Detection of laminin receptor mRNA in human cancer cell lines and colorectal tissues by in situ hybridization. Am J Pathol 1992;141:1703-1083.
- Campo E, Muñoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. Am J Pathol 1994;145:301-309.
- Castells A, Bessa X, Daniels M, Ascaso C, Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Gargallo L, Novell F, Astudillo E, Filella X, Piqué JM. Value of postoperative surveillance after radical surgery for colorectal cancer. Results of a cohort study. Dis Colon Rectum 1998;41:714-724.
- Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK. Mapping of a new target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. Gastroenterology 1999a; 117: 831-837.
- Castells A, Kroser J, Rustgi AK. Gastrointestinal neoplasms. In: Beers MH, Berkow R, eds. The Merck Manual of Geriatrics, 3rd ed. West Point, PA: Merck & Co, 2000a:1134-1153.
- Castells A, Piqué JM. Tumores intestinales. En: Farreras V, Rozman C, eds. Medicina Interna. 14ª ed. Harcourt, Madrid, 2000b: 261-272.
- Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Solé M, Capella G, Lluis F, Fernandez-Cruz L, Navarro S, Farré A. K-ras mutations in DNA extracted from plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. J Clin Oncol 1999;17:578-584.
- Chen W-S, Wei S-J, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metàstasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-

2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, Etodolac. Int J Cancer 2001;91:894-899.

- Chen X, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J,Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. Nat Med 1996;9:1033-1035.
- Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. Gastroenterology 1995; 109:1685-1699.
- Cvetkovska E, Asea A, Hellstrand K, Edström S. Tumor suppressive action of indomethacin is NK-cell-independent. Anticancer Research 1997;17:3403-3408.
- Delgado S, Lacy AM, Filella X, Castells A, Garcia-Valdecasas JC, Pique JM, Momblan D, Visa J. Acute phase response in laparoscopic and open colectomy in colon cancer: randomized study. Dis Colon Rectum 2001;44:638-646.
- Denis MG, Lipart C, Leborgne J, LeHur PA, Galmiche JP, Denis M, Ruud E, Truchaud A, Lustenberger P. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. Int J Cancer 1997;74:540-544.
- Denis MG, Tessier M-H, Dreno B, Lustenberger P. Circulating micrometastases following oncological surgery. Lancet 1996;347:913.
- Doi K, Akaike T, Horie H, Noguchi Y, Fujii S, Beppu T, Ogawa M, Maeda H. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. Cancer 1996;77(8 Suppl):1598-1604.
- Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vechiato N, Macri E, Fornasarig M, Boiochi M. High prevalence of activated intraepitelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. Am J Pathol 1999;154:1805-1913.
- Douglas HO Jr, Moertel CG, Mayer RJ, Thomas RP, Lindblad AS, Mittleman A, Stablein DM, Bruckner HW. Survival after postoperative combination treatment of rectal cáncer. N Engl J med 1986;315:1294-1295.

- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA, Lipsky PE. Cyclooxigenase in biology and disease. FASEB J 1998;12:1063-1073.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 1994;107:1183-1188.
- EberhartCE and DuBois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. Gastroenterology 1995;109:285-301.
- Eckert K, Fuhrmann-Selter T, Maurer HR. Docetaxel enhances the expression of E-cadherin and carcinoembryonic antigen (CEA) on human colon cancer cell lines in vitro. Anticancer Res 1997;17:7-12.
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemier M, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4 fibronectin binding site. Cell 1990;60:577-584.
- Eling TE, Thompson DC, Foureman GL, Curtis JF, Hughes MF. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990;30:1-45.
- Elizalde JI, Gómez J, Panés J, Lozano M, Casadevall M, Ramírez J, Pizcueta P, Marco F, Díaz de Rojas F, Granger DN, Piqué JM: Platelet activation in mice and human *Helicobacter pylori* infection. J Clin Invest 1997,10:996-1005.
- Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E-and P-selectins in vivo. Circ Res 1996;79:560-569.
- Eschwêge P, Dumas F, Blanchet P, Le Maire V, Benoit G, Jardin A, Lacour B, Loric S. Haematogenous dissemination of prostatic epithelial cell during radical prostatectomy. Lancet 1995;346:1528-1530.
- Esteve J, Kricker A, Parkin DM, eds. Facts and figures of cancer in the European comunity. IARC, Lyon, 1993.

- Famaey JP. In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: and overview. Inflamm res 1997;46:437-446.
- Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia reperfusion injury in rat liver. J Leukoc Biol 1995;57:368-374.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 1990a; 247:49-56.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorogenesis. Cell 1990;61:759-767.
- Ferrara N. Natural killer cells, adhesion and tumor angiogenesis. Nature Medicine 1996;2:971-972.
- Fidler IJ, Kripke ML. Tumor cell antigenicity, host immunity and cancer metastasis. Cancer Immunol Immunother1980;7:201-205.
- Fidler IJ. Macrophages and metastasis: a biological approach to cancer therapy: presidential adress. Cancer Res 1985;45:4714-4726.
- Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RV, Kennedy BJ, Murphy GP. AJCC cancer staging manual 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven;1997.
- Fleshman JW, Nelson H, Peters WR, Kim HC, Larach S, Boorse RR, Ambroze W, Legget P, Bleday R, Stryker S, Christenson B, Wexner S, Senagore A, Rattner D, Sutton J, Fine AP. Early results of laparoscopic surgery for colorecatl cancer. Retrospective analysis of 372 patients treated by Clinical Outcomes of Surgical Therapy (COST) Study Group. Dis Colon Rectum 1996;39(Suppl 10):S53-S58.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. Nature Rev 2001;1:55-67.

- Folkman J. 1995. Tumor angiogenesis. In The molecular basis of cancer. Mandelsohn, J., P.M. Howley, M.A. Israel, and L.A. Liotta, editors. W.B. Saunders & Co., Philadelphia, 206-232.
- Fox FE, Ford HC, Douglas R, Cherian S, Nowell PC. Evidence that TGF-beta can inhibit human T-lymphocyte proliferation thorough paracrine and autocrine mechanisms. Cell immunol 1993;150:45-58.
- Fox SB, Turner GDH., Gatter KC, Harris A.L. The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. J Pathol 1995;177:369-376.
- Franklin ME, Rosenthal D, Abrego-Medina D, Dorman JP, Glass JL, Norem R, Diaz A. Prospective comparison of open vs. laparoscopic colon surgery for carcinoma. Five years results. Dis Colon Rectum 1996;39:S35-S46.
- Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. Gut 2001;48:515-521.
- Fries JW, Williams AJ, Atkins RC, Newman W, Lipscomb MF, Collins T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. Am J Pathol 1993;143:725-737.
- Fujita S, Kudo N, Akasu T, Moriya Y. Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. Int J Colorectal Dis 2001;16:141-146.
- Fukumara D, Saleshi HA, Witwer B, Tuma RF, Melder RJ, Jain RK: Tumor necrosis factor α-induced leukocyte adhesion in normal and tumor vessels: effect of tumor type, transplantation site, and host strain. Cancer Res 1995, 55:4824-4829.

- Fukumura D, Yuan F, Endo M, Jain RK. Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. Am J Pathol 1997;150:713-725.
- Funaki NO, Tanaka J, Hosotani R, Kogire M, Suwa H, Imamura M. Quantitative analysis of carcinoembryonic antigen messenger RNA in peripheral venous blood and portal blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 1998a;4:855-860.
- Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. Br J Cancer 1998b; 77:1327-1332 .
- Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. Transforming growth factor-β inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. J Immunol 1993;150:4494-4503.
- Gamble JR, Vadas MA. Endotelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-β. J Immunol 1991;146:1149-1154.
- Gamble JR, Vadas MA. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by Transfrming Growth Factor-β1. Science 1988;242:97-99.
- Garcia-Olmo D, Ontañon J, Garcia-Olmo DC, Vallejo M, Cifuentes J. Experimental evidence does not support use of the “no-touch” isolation technique in colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1999;42:1449-1456.
- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. Nature 1990;343:757-760.
- Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. J Clin Oncol 1994;12:725-729.
- Ghang AE, Shu S. Current status of immunotherapy of cancer. Crit Rev Oncol 1996;22:213.

- Ghossein RA, Coit D, Brennan M, Zhang ZF, Wang Y, Bhattacharya S, Houghton A, Rosai J. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. Clin Cancer Res 1998;4:419-4298.
- Ghossein RA, Rosai J, Scher HI, Seiden M, Zhang ZF, Sun M, Chang G, Berlane K, Krithivas K, Kantoff PW. Prognostic significance of detection of prostate-specific antigen transcripts in the peripheral blood of patients with metastatic androgen-independent prostatic carcinoma. Urology 1997;50:100-105.
- Giardello FM, Brensinger JD, Petersen GM, Luce MC, Hylind LM, Bacon JA, Booker SV, Parker RD, Hamilton SR. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 1997; 336:823-827.
- Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. Gastroenterology 2001; 121:198-213.
- Gohongi T, Fukumara D, Bucher Y, Yun C-O, Soff GA, Compton C, Todoroki T, Jain RK. Tumor-host interactions in the gallbladder supress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor β1. Nature Med 1999;5:1203-1208.
- Gorelik E. Augmentation of the antimetastatic effect of anticoagulant drugs by immunostimulation in mice. Cancer Res 1987;47:809-815.
- Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflamation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J Leukoc Biol 1994;55:662-675.
- Griffioen AW, Damen CA, Martinotti S, Blihjam GH, Groenewegen GC. Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is supressed in human malignancies: the role of angiogenic factors. Cancer Res 1996a;56:1111-1117.
- Griffionen AW, Damen CA, Blijham GH, Croenewegen G. Tumor angiogenesis is acompanied by a decreased inflammatory response of tumor.associated endothelium. Blood 1996b ;88 :667-673.

- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albersten H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. Cell 1991; 66:589-600.
- Gross H, Verwer B, Houck D, Hoffman RA, and Recktenwald D. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frecuencies as low as 10^{-7}, Proc Natl Acad Sci 1995;92:537-541.
- Grüngberg E, Eckert K, Maurer HR. Doxetacel treatment of HT-29 colon carcinoma cells reinforces the adhesion and immunocytotoxicity of peripheral blood lymphocytes in vitro. Int J Cancer 1998:12:957-963.
- Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nature Rev 2001;1:11-21.
- Gusterson B, Ott R. Occult axillary lymph-node micrometastases in breast cancer. Lancet 1990;336:434-435.
- Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH, Dobrovic A. Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease. Mol Med 1995;1:789-794.
- Hayashi N, Egami H, Kai M, Kurusu Y, Takano S, Ogawa M. No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. Surgery 1999;25: 369-374.
- Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, Nakamura Y. Genetic diagnosis of lymph-node metàstasis in colorectal cancer. Lancet 1995;345:1257-1259.
- Heinimann K,Müllhaupt B, Weber W, Attenhofer M, Scott RJ, Fried M, Martinoli S, Muller H, Dobbie Z. Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status. Gut 1998; 43:675-679.

- Hellwig S., Damen C., van Adrichem N., Blijham G., Groenewegen G., Griffioen A.W. Endothelial CD34 is supressed in human malignancies: role of angiogenic factors. Cancer Lett 1997;120:203-211.
- Henninger DD, Panés J, Eppihimer J, Rusell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. J Immunol 1997;158:1825-1832.
- Hernandez S, Bessa X, Bea S, Hernandez LL, Nadal A, Mallofre C, Myntane J, Castells A, Fernandez PL, Cardesa A, Campo E. Differential Expression of cdc25 Cell Cycle-Activating Phosphatases in Human Colorectal Carcinoma. Lab Invest 200;81:465-473.
- Hia T, Neilson K. Human cyclooxigenase-2 cDNA. Proc Natl Can Inst 1992;89:7384-7388.
- Hillaire S, Barbu V, Boucher E, Moukhtar M, Poupon R. Albumin messenger RNA as a marker of circulating hepatocytes in hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 1994;106:239-242.
- Hixson LJ, Alberts DS, Krutzsch M, Einsphar J, Brendel K, Gross PH, Paranka NS, Baier M, Emerson S, Pamukcu R. Antiproliferativ effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs against human colon cancer cells. Cancer Epidemiol Bimarkers Prev 1994;3:433-438.
- Hoffman G, Baker J, Doxey JB, Hubbard GW, Ruffin WK, Wishner JA. Minimally invasive surgery for colorectal cáncer. Initial follow-up. Ann Surg 1996;223:790-798.
- Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asanos T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. Nature medicine 1999;5:1203-1208.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253:49-53.

- Hostetter RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi KF, Fan D, Toth C, Thomas P, Jessup JM. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metàstasis. J Natl Cancer Inst. 1990;82:380-385.
- Houlston R, Crabtree M, Phillips R, Tomlinson I. Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. Gut 2001;48:1-5.
- Hsi LC, Baek SJ, Eling TE. Lack of cyclooxigenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. Exp Cell Res 2000;256:563-570.
- International Multicentre Pooled Analyisis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. Lancet 1995;345:939-944.
- International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. J Clin Oncol 1999;17:1356-1363.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquotous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 1993;363:558-561.
- Issekutz AC, Lopes N. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leukocyte transendothelial migration and modulation by interferon gamma. Immunology 1993;79:600-607.
- Jacobi CA, Ordemmann J, Bohm B, Zieren HU, Liebenthal C, Volk HD, Muller JM. The influence of laparotomy and laparoscopy on tumor growth in a rat model. Surg Endosc 1997;11:618-621.
- Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, at al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology 2000;118:829-834.

- Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmueller G, Schildberg FW. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. J Clin Oncol 1996;14:1810-1817.
- Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:4392-4396.
- Jessup JM, Giavazzi R, Campbell D, Cleary K, Morikawa K, Fidler IJ. Growth potential of human colorectal carcinomas in nude mice: association with the preoperative serum concentration of carcinoembryonic antigen in patients. Cancer Res 1988;48:1689-1692.
- Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumor cells. British Journal of Cancer 1995;72:268-276.
- Jonas S, Windeatt S, O-Boateng A, Fordy C, Allen-Mersh TG. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Gut 1996;39:717-721.
- Jutila MA, Rorr L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrofil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and Mac-1. J Immunol 1989;143:3318-3324.
- Kammerer R, von Kleist S. CEA expression of colorecatl adenocarcinoma is correlated with their resistance against LAK-cell lysis (Kamerer R, von Kleist S. CEA expression of colorectal adenocarcinoma is crrelated against LAK-cell lysis. Int J Cancer 1994;57:341-347.
- Kapiteijn E, Marjnen CAM, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, âhlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excison for resectable cáncer. N Engl J Med 2001;345:638-646.

- Kim SH, Milson JW, Gramlich TL, Toddy SM, Shore GI, Okuda J, Fazio VW. Does laparoscopic vs conventional surgery increase exfoliated cancer cells in the peritoneal cavity during resection of colorectal cancer?. Dis Colon Rectum 1998;41:1134-1140.
- Kishimoto TK, Jutila TA, Berger EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesin proteins inversely regulated by chemotactic factors. Science 1989;245:1238-1241.
- Kockerling F, Reymond MA, Schneider C, Wittekind C, Scheidbach H, Konradt J, Johler L, Barlehner E, Kuthe A, Bruch HP, Hohenberger W. Prospective multicenter study of the quality of oncologic resections in patients undergoing laparoscopic colorectal surgery for cancer. The Laparoscopic Colorectal Surgery Study Group. Dis Colon Rectum 1998; 41:963-970.
- Kraling BM, Razon MJ, Boon LM, Zurakpwski D, Seachord C, Darveau RP, Mulliken JB, Corless CL, Bischoff J. E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human menangioma. Am J Pathol 1996;148:1181-1191.
- Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand H, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA, Twito DI, Morton RF, Veeder MH, Witzig TE, Cha S, Vidyarthi SC. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. N Engl J Med 1991;324:709-715.
- Kurose I, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN. Microvascular dysfunction induced by nonsteroidal anti-inflammatory drug: role of leukocytes. Am J Physiol 1996;270:G363-G369.
- Kuzu I., Bicknell R., Fletcher C.D., Gatter K.C. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. Lab Invest 1993;69:322-328.

- Lacy AM, Delgado S, Garcia-Valdecasas JC, Castells A, Pique JM, Grande L, Fuster J, Targarona EM, Pera M, Visa J. Port site metastases and recurrence after laparoscopic colectomy. A randomized trial. Surg Endosc 1998;12:1039-1042.
- Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Delgado S, Castells A, Taurá P, Pique JM, Visa J. Randomized trial of laparoscopic-assisted colectomy versus open colectomy for the treatment of non metastasic colon cancer. Lancet 2002;359:2224-2229.
- Lacy AM, García-Valdecasas JC, Delgado S, Grande L, Fuster J, Tabet J, Ramos C, Pique JM, Cifuentes A, Visa J. Postoperative complications of laparoscopic-assisted colectomy. Surg Endosc 1997; 11:119-122.
- Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Pique JM, Delgado S, Campo E, Bordas JM, Taurá P, Grande L, Fuster J, Pacheco JL, Visa J. Short-term outcome analysis of a randomized study comparing laparoscopic vs open colectomy for colon cancer. Surg Endosc 1995;9:1101-1105.
- Lagadec P, Reveneau S, Lejeune P, Pinard D, Borman T, Bauer J, Jeanin J-F. Immunomodulator OM 163-Induced reversalof tumor-mediated immunosuppression and downregulation of TGF- β1 in vivo. J Pharmacol Exp Therap 1996;278:926-933.
- Langley RR, Rusell J, Eppihimer MJ, Alexander SJ, Gerritsen M, Specian RD, Granger DN. Quantification of murine endothelial cell adhesion molecules in solid tumors. Am J Physiol 1999;277:H1156-H1166.
- Laskly LA. Selectins: interpreters of cell specific carbohydrate information during inflamation. Science 1992;258:964-969.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 1993;75:1215-1225.

- Leather AJM, Gallegos NC, Kocjan G, Savage F, Smales CS, Hu W, Boulos PB, Northover JMA and Philips RKS. Detection and enumeration of circulating tumor cells in colorectal cancer. Br J Surg 1993;80:777-780.
- Lehr HA, Leuning M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. Am J Pathol 1993;143:1055-1062.
- Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, Van de Velde CJH, Hermans J, Van Krieken J, Cornelisse CJ, Tollerman R. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. N Engl J Med 1998;339:223-228.
- Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. Lancet 1992;340:685-689.
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Significance of hematogeneous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res 1976;36:889- 894.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasión and metàstasis: an imbalance of positive and negative regulation. Cancer Res 1991;51:S5054-S5059.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann Intern Med 1994;120:227-237.
- Macdonald F, Ford CHJ. Molecular biology of cancer. Oxford, Bios Scientif Publishers Ltd, 1997.
- Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, Jones J, Rockette H. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes'B versus Dukes'C colon cancer: Results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Adjuvant Studies (C-01, C-02, C-03, C-04). J Clin Oncol 1999;17:1349-1355.
- Martling AL, Holm T, Rutqvist L-E, Moran BJ, Heald RJ, Cedermark B, for the Stockolm Colorectal Cáncer Study Group and the Basingstoke Bowel Cáncer

Research Project. Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the country of Stockolm. Lancet 2000;356:93-96.

- Massagué J. The transforming growth factor-β family. Annu Rev Cell Biol 1990;6:597-641.
- Mathew G, Watson DI, Rofe AM, Baigrie CF, Ellis T, Jamieson GG. Wound metastases following laparoscopic and open surgery for abdominal cancer in a rat model. Br J Surg 1996; 83:1087-1090.
- Maurer C.A., Friess H., Kretschmann B., Wildi S., Müller C., Graber H., Schilling M., Büchler M.W. Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer. Int J Cancer 1998;79:76-81.
- McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrofils and monocytes on activated platelets and endothelium. J Cell Biochem 1991;45:156-161.
- Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. Randomised trial of surgery alone versus surgery followed by radiation therapy for mobile cancer of the rectum. Lancet 1996;348:1610-1614.
- Melder RJ, Koening GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LM, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to the endothelium. Nat Med 1996;2:992-997.
- Mellado B, Colomer D, Castel T, Muñoz M, Carballo E, Galán M, Mascaró JM, Vives-Corrons JL, Grau JJ, Estapé J. Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: Association with clinical stage and prognosis. J Clin Oncol 1996;14:2091-2097.
- Milsom JW, Böhm B, Hammerhofer KA, Fazio V, Seiger E, Elson P. A prospective, randomized trial comparing laparoscopic versus conventional techniques in colorectal cancer surgery: A preliminary report. J Am Coll Surg 1998;187:46.

- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, Mc Daniel ML, Williamson JR, Currie MG. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. Eur J Pharmacol 1993;23:119-125.
- Miyazono F, Takao S, Natsugoe S, Uchikura K, Kijima F, Aridome K, Shinchi H, Aikou K. Molecular detection of circulating cancer cells during surgery in patients with biliary-pancreatic cancer. Am J Surg 1999;177:475-479.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant theraphy for stage II/Dukes'B2 colon cancer. J Clin Oncol 1995b;13:2936-2943
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Tangen CM, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, Veeder MH, Mailliard JA. Fluoracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: A final report. Ann Intern Med 1995a;122:321-326.
- Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. Clin Cancer Res 2001;7:4080-4085.
- Mooradian DL, McCarthy JB, Komanduri KV, Furcht LT. Effects of transforming growth factor-β1 on human pulmonary adenocarcinoma cell adhesion, motility, and invasion in vitro. J Natl Cancer Inst 1992;84:523-527.
- Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG, Gomella LG. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. Cancer Res 1992;52:6110-6112.
- Murata J, Corradin SB, Janzer RC, Juillerat-Jeanneret L. Tumor cells suppress cytokine-induced nitric-oxide (NO) production in cerebral endothelial cells. Int J Cancer 1994;59:699-705.

- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res 1998;58:3491-3494.
- Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H, Takeda O, Sugai S, Imaoka S, Nakamura Y. Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. Dis Colon Rectum 1997;40:S29-S36.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell 1994;78:915-918.
- Nawroz H, Koch W, Anker P, Stround M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. Nat Med 1996;9:1035-1037.
- Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T, Collins T. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kB as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. Mol Cell Biol 1995;15:2558-2569.
- Nelson H, Petrelli N, Carlin A, Couture J, Fleshman J, Guillem J, Miedema B, Ota D, Sargent D. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. J Natl Cancer Inst 2001;93:583-596.
- Nelson H, Ramsey P.S., Donohue J.H., Wold L.E. Cell adhesion molecule expression within the microvasculature of human colorectal malignancies. Clin Immunol Immunopathol 1994;72:129-136.
- NIH Consensus Conference: Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 1990;264:1444-1450.
- Nishizaki T, Matsumata T, Kanematsu T, Yasunaga C, Sugimachi K. Surgical manipulation of VX2 carcinoma in the rabbit liver evokes enhancement of metàstasis. J Surg Res 1990;49:92-97.
- Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse

transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. Am J Pathol 1996;148:649-656.

- O'Conell MJ, Laurie JA, Kahn M, Fitzgibbons RJ Jr, Erlichman C, Sheperd L, Moertel CG, Kocha WI, Pazdur R, Wiehand HS, Rubin J, Vukov AM, Donohue JH, Krook JE, Figueredo A. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high risk colon cancer. J Clin Oncol 1998;16:295-300.
- O'Sullivan GC, Collins JK, Kelly J, Morgan J, Madden M, Shanahan F. Micrometastases: marker of metastasic potencial or evidence of residual disease?. GUT 1997;40:512-514.
- O'Sullivan GC, Collins JK, O'Brien F, Crowley B, Murphy K, Lee G, Shanahan F. Micrometastases in bone marrow of patients undergoing curative surgery for gastrointestinal cancer. Gastroenterology 1995;109: 1535-1540.
- Ortaldo JR, Mason AT, O'Shea JJ, Smyth MJ, Falk LA, Kennedy ICS, Longo DL, Ruscetti FW. Mechanistic studies of transforming growth factor-β inhibition of IL-2-dependent activation of CD3- large granular lymphocyte functions. J Immunol 1991;146:3791-3798.
- Orucevic A, Lala PK. NG-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, ameliorates interleukin 2-induced capillary leakage and reduces tumour growth in adenocarcinoma-bearing mice. Br J Cancer 1996;73:189-196.
- Osborne M, Wong GY, Asina S, Old LJ, Cote RJ, Rosen PP. Sensivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow. Cancer res 1991;51:2706-2709.
- Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. Gastroenterology 1998a;114:1066-1090.

- Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. Am J Physiol 1998;269:1955-1964.
- Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. Am J Physiol 1995;269:H1955-H1964.
- Panés J, Perry MA, Anderson DC, Muzykantov VR, Carden DL, Miyasaka M, Granger DN. Portal hypertension enhances endotoxin-induced intercellular adhesion molecule 1 up-regulation in rat. Gastroenterology 1996;110:866-874.
- Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. J Natl Can Inst 1999;91:1113-1124.
- Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients witn non-small-cell lung cancer without overt metastases. Lancet 1996; 347:649-653.
- Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, Zhan ZA, Araia R, Glover C, Henry MM, Allen-Mersh TG. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. Ann Surg 2002;235:226-231.
- Percesepe A, Borghi F, Menigatti M, Losi L, Foroni M, Di Gregorio C, Rossi G, Pedroni M, Sala E, Vaccina F, Roncucci L, Benatti P, Viel A, Genuardi M, Marra G, Kristo P, Peltomaki P, Ponz de Leon M. Molecular screening for hereditary non-polyposis colorectal cancer: a prospective, population-based study. J Clin Oncol 2001; 19:3944-3950.
- Petersen VC, Baxter KJ, Love SB, Shepherd NA. Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes'B colon cancer. GUT 2002;51:65-69.

- Piali L, Fichtel A, Terpe HJ, Imhof BA, Gisler RH. Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is supressed by melanoma and carcinoma. J Exp Med 1995;181:811-816.
- Piazza GA, Rahm ALK, Krutzsc M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamucku R, Ahnen DJ. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell crowth by inducing apoptosis. Cancer Research 1995;55:3110-3116.
- Pool EH. Cancer cells in the blood stream. Am J Surg 1994;21:99-102
- Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Gen J, Giardello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 1993; 329:1982-1987.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 1992;359:253-257.
- Qiao L, Hanif R, Sphicas E, Shiff SJ, Rigas B. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Biochemical Pharmacology 1998;55:53-64.
- Radinsky R, Aukerman SL, Fidler IJ. The heterogeneous nature of metastatic neoplasms: relevance to bioteraphy. In: Oldham RK, ed. Principles of cancer bioteraphy, ed 3. New York: Marcel Dekker, 1996.
- Renkonen R., Paavonen T., Nortamo P., Gahmberg C.G. Expression of endothelial adhesion molecules *in vivo*. Increased endothelial ICAM-2 expression in lymphoid malignancies. Am J Pathol 1992;140:763-767.
- Rivoltini L, Cattoretti G, Arienti F, Mastroianni A, Melani C, Colombo MP, Parmiani G. The high lysability by LAK cells of colon-carcinoma cells resistant to doxorubicin is associated with a high expression of ICAM-1, LFA-3, NCA and a less-differentiated phenotype.Int J Cancer 1991;47:746-754.

- Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivasta S. A National Cancer Institute workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. J Natl Cancer Inst 1997;89:1758-1762.
- Rosenberg SA. The immunotherapy of solid cancers based on cloning the gene encoding tumor-rejection antigens. Annu Rev Med 1996;47:481-491.
- Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. N Engl J Med 1994; 331:1694-1072.
- Sales JP, Wind P, Douard R, Cugnenc PH, Loric S. Blood dissemination of colonic epithelial cells during non-touch surgery for rectosigmoid cancer. Lancet 1999;354:392.
- Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. Blood 1992;80:795-800.
- Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A, Campo E Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. Gastroenterology 1997;113:1906-1915.
- Sans M, Panés J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, Palacín A, Fernández-Checa JC, Anderson DC, Lobb R, Piqué JM: VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. Gastroenterology 1999,116:874-883.
- Schmid-Schönbein GW, Usami S, Sjalak R, Chien S. The interaction of leukocytes and erithrocytes in capillary and postcapillary vessels. Microvas res 1980;19:45-70.
- Shan SQ, Rosner GL, Braun RD, Hahn J, Pearce C, Dewhirst MW. Effects of diethylamine/nitric oxide on blood perfusion and oxygenation in the R3230Ac mammary carcinoma. Br J Cancer 1997;76:429-437.

- Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. J Biol Chem 2000;275:33951-33956.
- Shif SJ, Rigas B. Nonsteroidal anti-imflammatory drugs and colorectal cancer: Evolving concepts on their chemopreventive actions. Gastroenterology 1997;113:1992-1998.
- Shiff SJ, Qiao L, Tsai L-L, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. J Clin Invest 1995;96:491-503.
- Silber A, Newman KA, Reimsnn A, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ. Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. Lab. Invest 1994;70:163-175.
- Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Lancet 1991;338:1227-1229.
- Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 anf Mac-1 with intracellular adhesion molecule 1 in facilating adherence and transendothelial migration of human neutrofils in vitro. J Clin Invest 1989;83:2008-2017.
- Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. Int J Cancer 1996;69:278-282.
- Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Marxsen J, Krüger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. Cancer Res 1997;57:3106-3110.

- Soletormos G, Fogh JM, Sehested-Hansen B, Spang-Thomsen M, Schioler V, Dombernowsky P, Skovsgaard T.Carcino-embryonic antigen in monitoring the growth of human colon adenocarcinoma tumour cells SK-CO-1 and HT-29 in vitro and in nude mice. Eur J Cancer 1997;33:108-114.
- Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. Am J Hum Genet 1998;62:1290-1301.
- Springer TA, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. Cell 1994;76:301-314.
- Staal-van den Brekel AJ, Thunnisen FB, Buurman WA, Wouters EFM. Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in non-smallcell lung carcinoma. Virchows Arch 1996;428:21-27.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 2000; 342:1946-1952.
- Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radioteraphy in resectable rectal cancer. N Engl J Med 1997;336:980-987.
- Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 1993;53:2472-2474.
- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li X-F, Shimizu J, Fujiwara H, Mamaoka T. Transforming growth factor-β-induced inhibition of T cell function. J Immunol 1991;146:1077-1082.
- Takahashi M, Fukuda K, Ohata T, Sugimura T, Wakabayashi K. Increassed expresion of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. Cancer Res 1997;57:1233-1237.

- Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Selding MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both DPC4 (SMAD4) and APC genes. Cell 1998; 92:645-656.
- Taketo M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis. J Natl Cancer Inst 1998;90:1609-1620.
- Taniguchi T, Makino M, Suzuki K, Kaibara N. Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma. Cancer 2000;89: 970-976.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. FASEB J 1995;9:866-873.
- Todryk SM, Chong H, Vile RG, Pandha H, Lemoine NR. Can immunotherapy by gene transfer tip the balance against colorectal cancer?. Gut 1998;43:445-449.
- Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koepen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor β1 cDNA escapes immunosurveillance. Proc Natl Acad Sci 1990;87:1486-1490.
- Tsuji M and DuBois R. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell 1995;83:493-501.
- Tsuji M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proc Natl Acad Sci 1997;94:3336-3340.
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawahoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxigenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998;93:705-716.
- Tsuruo T, Waeabata H, Lida H, Yomori T. Tumor-induced platelet aggregation and growth-promoting factors as determinants for successful tumor metastasis. Clin Exp Metastasis 1986;7:25-33.

- Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, Imai Y, Shimomukai H, Nomura Y, Matsuda Y, Matsuzawa Y. High levels of transforming growth factor β1 in patients with colorectal cancer: Association with disease progression. Gastroenterology 1996;110:375-382.
- Turnbull RB Jr, Kyle K, Eatson FR, Spratt J. Cáncer of the colon: the influence of the non-touch isolation technique on survival rates. Ann Surg 1967;166:420-427.
- Vallien G, Langley R, Jennings S, Specien R, Granger DN. Expression of endothelial cell adhesion molecules in neovascularized tissue. Microcirculation 2000;7:249-258.
- van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule 1. J mol Med 1996;74:13-33.
- Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, Nagensgat FM, Kleibeuker JH, Griffioen G, Taal BG, Moller P, Wijnen JT. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than mlh1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. J Clin Oncol 2001;19:4074-4080.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology 1999;116:1453-1456.
- Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Study Group on herediatry nonpolyposis colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1991; 34:424-425.
- Vasen HFA, Van del Luijt RB, Slors JFM, Buskens E, de Ruiter P, Baeten CG, Schouten WR, oostvogel HJ, Kuijpers JH, Tops CM, Meera Khan P. Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familiall adenomatous polyposis. Lancet 1996; 348:433-435.

- Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. Science 1989; 244: 207-211.
- Vukasin P, Ortega AE, Greene FL, Steele GD, Simons AJ, Anthone GJ, Weston LA, Beart RW Jr. Wound recurrence following laparoscopic colon cáncer resection. Results of the American Society of Colon and Rectal Surgeons Laparoscopic Registry. Dis Colon Rectum 1996; 39:S20-S23.
- Wahl SM, McCartney-Francis N, Mehrenghagen S. Inflamatory and inmunomodulatory roles of TGF-β. Immunol Today 1989;10:258-262.
- Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, Oettgen HF. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer.N Engl J Med 1978;299:448-451.
- Watson RW, Redmond HP, McCarthy J, Burke PE, Bouchier-Hayes D. Exposure of the retroperitoneal cavity to air regulates early inflammatory responses to surgery in a murine model. Br J Surg 1995;82:1060-1065.
- Weiss L. Biomechanical interaction of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis. Cancer Metaastasis Rev 1992;11:227-235.
- Weitz J, Jienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, Doeberitz M. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. Clin Cancer Res 1998;4:343-348.
- Welch DR, Fabra A, Nakajima M. Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. Proc Natl Acad Sci 1990;87:7678-7682.
- Wexner S, Cohen S. Port-site metastases after laparoscopic colorectal surgery for cure of malignancy. Br J Surg 1995; 82:295-298.
- Whelan R, Sellars G, Allendorf J, Laird D, Bessler MD, Nowygrod R, Treat MR. Trocar site recurrence is unlike to result from aerosolization of tumor cells. Dis Colon Rectum 1996; 39:S7-S13.

- Wijnen JT, Vasen HFA, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. N Engl J Med 1998; 339: 511-518.
- Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Goodle F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH, Rosen L, Zapka JG, Olsen SJ, Giardello FM, Sisk JE, van Antwerp R, Brown-Davis C, Marciniack DA, Mayer RJ. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. Gastronterology 1997; 112:594-642.
- Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Stenberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. N Engl J Med 1993; 329:1977-1981.
- Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. Carcinogenesis 1998;19:711-721.
- Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB, Gordon PH, Petrelli NJ, Deutsch M, Mamounas E, Wickerham DL, Fisher ER, Rockette H, Fisher B. Randomized trial of postoperative adjuvant therapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. J Natl Cancer Inst 2000;92:388-396.
- Wong LS, Bateman WJ, Morris AG, Fraser IA. Detection of circulating tumour cells with the magnetic activated cell sorter. Br J Surg 1995;82:1333-1337.
- Wood DP, Banerjee M. Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. J Clin Oncol 1997;15:3451-3457.
- Wu NZ, Klitzman B, Dodge R, Dewhirst MW: Diminished leukocyte-endothelial interaction in tumor microvessels. Cancer Res 1992,52:4265-4628.
- Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase

polymerase chain reaction for cytokeratin 20. Cancer 1998;79: 288-293.

- Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. Ann Surg 1999;32:58-65.
- Yamamoto T, Terada N, Nishizawa Y, Tanaka H, Akedo H, Seiyama A, Shiga T, Kosaka H. Effects of NG-nitro-L-arginine and/or L-arginine on experimental pulmonary metàstasis in mice. Cancer Lett 1994;87:115-120.
- Yamamoto T, Terada N, Seiyama A, Nishizawa Y, Akedo H, Kosaka H. Increase in experimental pulmonary metàstasis in mice by L-arginine under inhibition of nitric oxide production by NG-nitro-L-arginine methyl ester. Int J Cancer 1998;75:140-144.
- Ye C, Kiriyama K, Mistioka C, Kannagi R, Ito K, Watanabe T, Kondo K, Akiyama S, Takagi H. Expression of E-selectin on endothelial cells of small veins in human colorectal cancer. Int J Cancer 1995;61:455-460.
- Yu W.G., Ogawa M., Mu J., Umehara K., Tsujimura T., Fujiwara H., Hamaoka T. IL-12 induced tumor regression correlates with in situ activity of IFN-γ produced by tumor infiltrating cells and its secondary induction of antitumor pathways. J Leuk Biol 1997;62:450-457.
- Zimmermann KC, Sarbia M, Weber A, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxigenase-2 expression in human esophageal carcinoma. Cancer Res 1999;59:198-204.
- Zippelius A, Kufer G, Honold MW, Kollerman MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K. Limitations of reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cellsin bone marrow. J Clin Oncol 1997:15:2701-2708.

- Zocchi MR, Poggi A: Lymphocyte-endothelial cell adhesion molecules at the primary tumor site in human lung and renal cell carcinomas. J Natl Can Inst 1993,85:246-247.