

EVENIMENTE BIOLOGICE ÎN CASCADA METASTATICĂ ASOCIATĂ CANCERULUI DE COLORECTAL

Irina-Draga Căruntu¹, Simona Eliza Giușcă², Gioconda Dobrescu¹

1 Disciplina Histologie

2 Clinica I Chirurgie „I. Tănăsescu-Vl. Buțureanu”

Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași

BIOLOGICAL EVENTS IN THE METASTATIC CASCADE ASSOCIATED TO COLORECTAL CANCER (Abstract): The hepatic metastasis process, a specific study subject within the carcinogenesis framework is characterized by the selection, at the primary tumor level, of a tumoral cell population able to undergo several mandatory stages, generally designed as the metastasis cascade. The study of the mechanisms involved in the biology of the metastasis, by molecular cell-to-cell and cell-to-matrix interactions, respectively, opens new perspectives for a clinical and therapeutic approach oriented towards the intrinsic events that govern over the transformation from normal to malignant. The article concentrates the information present in the publications mainstream, the text organization being focused on the angiogenesis, the overcoming adhesive interactions at the primary tumor, the disruption of the basement membrane followed by the initiation of tumoral invasion, the arrest and adhesion of metastatic tumor cells in target organs. The overview of the metastasis cascade from the point of view of the general rules acting disregarding the location is doubled by details referring strictly to the hepatic metastasis secondary to colorectal cancer. The presentation of some molecular biology notions supports the intention to achieve a connection between the pathologist' and the surgeon's insight.

KEY WORDS: METASTASIS, COLORECTAL CANCER, MECHANISM

Corespondență: Prof. dr. Irina-Draga Căruntu, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași, Disciplina Histologie, str. Universității, nr.16.

Cancerul colorectal este cea mai frecventă cauză a metastazelor hepatice, evidente clinic în momentul diagnosticului la 10-25% dintre pacienți și prezente în 60-70% din cazurile decedate [1]. Apariția metastazelor hepatice, 70-80% în intervalul de 2 ani după rezecția primară, constituie un factor de prognostic negativ, existența lor fiind asociată cu o rată de supraviețuire la 5 ani de sub 5% [1].

Metastazarea este definită ca un proces multistadial complex, a cărui desfășurare nu este întâmplătoare și în cadrul căruia celulele tumorale părăsesc tumora primară, stabilind noi focare neoplazice [2-7]. Subpopulații de celule tumorale cu diferite abilități de metastazare există în interiorul aceleiași tumori primare, iar metastazele rezultă din diseminarea selectivă a acelor celule tumorale care sunt capabile să participe la toate etapele cascadei de metastazare [2,3,4,5,7,8].

Celulele maligne, componente ale tumorii primare vascularizate, trebuie să invadeze structurile vasculare și limfatice, să formeze emboli în curentul sanguin, să supraviețuiască interacțiunii cu elementele figurate ale sângelui și cu sistemul imun și să fie transportate în situsuri organice situate la distanță [2,3,7,9]. La acest nivel vor fi extravazate, vor adera la structurile țintă și vor realiza tumori secundare [2,3,7,9]. Fenomenele de inițiere și progresie tumorală care au loc în noile localizări implică o serie de interacțiuni dinamice gazdă – tumoră [5,8]. Studiul mecanismelor intime ale carcinogenezei și metastazării a creat premisele de înțelegere a proprietăților biologice

ale celulelor tumorale [2,3,4,8,10]. Consecutiv activității diferitelor grupuri de cercetare axate asupra acestui domeniu a fost dezvoltat un model fiziopatologic care presupune – sintetic – succesiunea următoarelor evenimente: [1] angiogeneza; [2] afectarea adeziunii intercelulare la nivelul tumorii primare; [3] distrugerea membranei bazale și inițierea invaziei tumorale; [4] sechestrarea și adeziunea celulelor tumorale în organele țintă. Un rol extrem de important revine micromediului tumoral [2,3,4,7], în ultimii ani fiind descriși o multitudine de factori moleculari și genetici (ținte terapeutice potențiale) prezenți la acest nivel și intervenind în modularea imunologică în scop protumoral [4,10,11].

Lucrarea de față își propune să realizeze, în baza datelor din fluxul principal de publicații, o prezentare sistematizată a evenimentelor majore care caracterizează procesul de metastazare, în principal prin prisma elementelor definitorii de biologie moleculară. Cu toate că metastazarea urmează în principiu aceleași reguli generale, textul face trimiteri concrete către localizarea hepatică, secundară cancerului colorectal. Fără a ne propune o abordare exhaustivă a subiectului (practic imposibilă datorită avalanșei de studii dedicate carcinogenezei și metastazării), considerăm că informația oferită are un grad ridicat de utilitate în instruirea celor interesați, accentuând acele repere esențiale care asigură trecerea de la perspectiva patologicului, la cea a chirurgului.

1. ANGIOGENEZA

Termenul de angiogeneză, definit ca formare de noi vase de sânge, a fost introdus în 1787 de John Hunter [12]. Corelarea angiogenezei cu carcinogeneza s-a realizat câteva sute de ani mai târziu, în 1971, ca urmare a observațiilor legate de limitarea extinderii tumorale în absența unei vascularizații proprii [13,14]. S-a stabilit astfel că în dezvoltarea unei tumori există inițial o fază prevasculară urmată, odată cu creșterea volumului tumoral peste 2-3 mm³ – echivalentul a 100-300 celule tumorale [12], de o fază de angiogeneză tumorală. Formarea de vase sanguine noi și, implicit, translarea spre fenotipul tumoral angiogenic sunt controlate prin factori angiogenetici stimulatori și inhibitori, eliberați atât de celulele neoplazice, cât și de matricea extracelulară sau celulele gazdei [15-19]. Neovascularizația este extrem de importantă în evoluția unei tumori deoarece, prin creșterea perfuziei în teritoriul celulelor maligne, asigură aportul de nutrienți și oxigen, în paralel cu eliminarea cataboliților, cu rezultat în stimularea creșterii tumorale [9]. Într-o tumoră primară, zonele cu microdensitate vasculară crescută sunt cele care conțin celulele apte de metastazare, exprimând fenotipul angiogenic [2,18].

Conceptul angiogenezei tumorale a fost susținut în principal prin numeroase dovezi experimentale și clinice, rezultate ca urmare a unor investigații axate pe studiul factorilor pro și anti-angiogenici și ai receptorilor endoteliali corespunzători [19]. Cercetările, orientate în principal spre identificarea celulelor responsabile de producerea factorilor angiogenici și aprofundarea mecanismelor moleculare și genetice de stimulare / inhibare a procesului de angiogeneză [9,12,17,18,20,21,22], au avut impact direct în creșterea valorii prognostice a angiogenezei tumorale [23]. Sunt descriși în prezent peste 12 factori angiogenici, cei mai mulți fiind proteine sau citokine [9,24]. Ei acționează fie direct, prin stimulare endotelială, fie indirect, prin intermediul unor mecanisme paracrine care implică participarea altor celule [16].

Angiogeneza poate fi evaluată printr-o serie largă de markeri endoteliali, foarte utilizați fiind factorul VIII (von Willebrand), CD31 (PECAM-1), CD34, CD105, Tie [9,12,18]. Deoarece acești markeri sunt exprimați de celulele endoteliale atât în

țesuturile normale, cât și în cele tumorale, identificarea microvascularizației exclusiv tumorale este dificilă [12]. Preocupările specialiștilor au vizat prioritar markerii specifici statusului malign, recent fiind identificați, prin compararea ADN-ul celulelor endoteliale din mucoasa colonică normală cu cel al celulelor endoteliale obținute din tumorile colorectale, 9 markeri endoteliali tumorali (*eng.* TEMs – Tumor Endothelial Markers), implicați direct în angiogeneza tumorală [25,26].

Dintre factorii angiogenici implicați în reglarea angiogenezei tumorale, cei mai cunoscuți sunt VEGF (*eng.* Vascular Endothelial Growth Factor – factorul de creștere endotelial vascular), FGF (*eng.* Fibroblast Growth Factor – factorul de creștere fibroblastic), TGF α/β (*eng.* Transforming Growth Factor - factorul de transformare a creșterii α/β) și angiogenina. VEGF a fost intens studiat în raport cu cancerul colorectal și în metastazele hepatice corespondente [9,17]. Pentru ceilalți factori, rolurile specifice în promoția metastazelor cancerelor colorectale nu sunt clar stabilite, ei având multiple activități și o varietate de efecte pe diferite celule [12].

VEGF a fost inițial descris ca un produs care induce creșterea permeabilității vasculare (motiv pentru care a primit denumirea de factor de permeabilitate vasculară) și care determină un important răspuns angiogenic [19,28,29,30]. Mai mult, VEGF induce producerea de colagenază, de activatori ai plasminogenului ca și ai inhibitorilor lor și stimulează transportul hexozei în aceste cellule [2]. Gena VEGF produce 5 tipuri de ARNm care codifică variante VEGF diferite prin greutatea moleculară și proprietățile biologice [31]. Familia VEGF (factori de creștere cu care leagă heparina) [30,31,32,33] include 5 molecule distincte cu structură de glicoproteină homodimerică: VEGF-A, -B, -C, -D, și PLGD (factorul de creștere placentar-like), alături de receptorii tirozin-kinazici specifici: VEGFR1, R2 și R3. Efectul biologic al VEGF este mediat prin activarea acestor receptori, localizați la nivel endotelial [34-37]. VEGF-A și VEGF-B sunt liganzi pentru FLT-1 sau VEGF-R1 [32, 35], VEGF-A și VEGF-C pentru Flk-1/KDR sau VEGF-R2 [32,36], iar VEGF-C și VEGF-D pentru FLT-4 sau VEGF-R3 [38,39,40]. VEGF-R3 este similar ca structură celorlalți doi receptori, dar care nu leagă VEGF-A, PlGF sau VEGF-B. VEGF-R1 și VEGF-R2 sunt exprimați în principal pe endoteliul vascular sanguin, în timp ce VEGF-R3 este restricționat la endoteliul limfatic, caracterizând procesul de limfangiogenază [12].

Nivelul activității angiogenice tumorale este strâns legat de proprietățile biologice și de prezența membrilor familiei VEGF. Valoarea VEGF ca factor prognostic este în atenția specialiștilor în domeniu, numeroase studii retrospective de evaluare fiind publicate în literatură - uneori cu rezultate și concluzii diferite, datorită numărului relativ redus de pacienți la care diferitele echipe de cercetare fac raportarea [41].

Expresia VEGF a fost intens studiată la nivelul mucoasei normale, în cancerul colonic primar și în cancerul colonic metastazat, precum și experimental, în liniile celulare de cancer colorectal, în fluxul principal de publicații existând peste 500 de articole concentrate pe acest subiect [19,42,43]. Expresia VEGF și a receptorilor se corelează cu extinderea neovascularizației și, implicit, cu microdensitatea vasculară [40,44,45], apreciată nu numai intratumoral, ci și la marginea de invazie, iar microdensitatea vasculară este mai mare în tumorile metastatice, comparative cu cele non-metastatice [46,47]. Deoarece expresia altor factori angiogenici nu diferă între tumora primară și cea secundară, VEGF este considerat un factor angiogenic important în cancerul de colon metastazat, VEGF și receptorii corespunzători fiind indicatori prognostici pentru risc metastatic crescut și pentru supraviețuire [43,44,48,49,50]. Nivelele VEGF sunt semnificativ mai mari în metastazele la distanță, comparative cu

cele apropiate, iar expresia VEGF scăzută se asociază cu o rată de supraviețuire semnificativ crescută comparativ cu expresia VEGF crescută [49]. KDR și flt 1 sunt puternic exprimați de către celulele endoteliale tumorale localizate în metastazele hepatice [2].

Rolul VEGF în angiogeneza tumorală are impact direct în dezvoltarea terapiei anti-angiogenice [51], administrarea de anticorpi monoclonali anti-VEGF inhibând creșterea tumorală *in vivo* și, experimental, reducând numărul și dimensiunea metastazelor hepatice [18,19,32,52-55].

2. AFECTAREA ADEZIUNII CELULARE LA NIVELUL TUMORII PRIMARE

Cele mai multe dintre celulele tumorale sunt reținute în interiorul tumorii primare datorită adeziunii intercelulare (interacțiuni de tip homotipic) sau adeziunii dintre receptorii de suprafață celulari și structurile membranei bazale (interacțiuni de tip heterotipic) [2]. Procesul de metastazare este condiționat de pierderea acestor adeziuni, iar celulele implicate direct sunt considerate celule metastazante, care pot invada local sau la distanță.

Moleculile cu rol determinant în adeziune la nivelul tumorii primare sunt integrinele, caderinele și proteinele imunoglobulin-like (molecule de adeziune celulară, CEA (*eng.* Carcinoembryonal Antigen – antigenul carcinoembrionar), DCC (*eng.* Deleted in Colorectal Cancer) [2,3,56,57].

Integrinele

Integrinele [58] constituie o superfamilie moleculară de importanță deosebită prin implicarea lor în comunicarea și interacțiunea între celule și materialul extracelular. Aceste molecule reprezintă de fapt receptori celulari membranari care mediază atașamentul celular la matricea extracelulară și migrarea celulară. Au o răspândire extrem de largă, majoritatea celulelor având mai mult decât o integrină pe suprafața lor. Integrinele [59] sunt proteine transmembranare formate din lanțuri α și β asociate necovalent; există 14 tipuri de subunități α și 8 tipuri de subunități β , astfel încât se formează cel puțin 20 de heterodimeri. Un singur lanț β poate interacționa cu o serie de lanțuri α , producând integrine care pot lega diferite componente ale matricei. Fiecare heterodimer are un domeniu intracelular, un domeniu transmembranar și un domeniu extracelular. Domeniul intracelular (intracitoplasmatic) se leagă, prin intermediul altor molecule intracelulare (talină, vinculină, α -actinină), de filamentele de actină. Domeniul extracelular prezintă situsurile de recunoaștere pentru liganzii (moleculele) matricei extracelulare – în mod concret pentru secvențe specifice de aminoacizi, inclusiv secvența Arg-Gly-Asp (RGD) caracteristică anumitor proteine matriciale. Integrina $\alpha 2 \beta 1$ recunoaște, în principal, colagenul de tip IV și laminina, integrina $\alpha 5 \beta 1$ recunoaște fibronectina. Deși nu în totalitate, majoritatea integrinelor sunt calciu-dependente; pentru cele mai multe ADN-ul corespunzător a fost clonat și secvențat.

În țesutul epitelial normal integrinele sunt prezente la nivelul celulelor stratului bazal, localizat pe membrana bazală, și sunt responsabile de realizarea joncțiunii de tip contact în focar [59]. Acest tip de joncțiune implică legarea integrinelor de citoschelet. Proteinele intracelulare care participă la formarea contactului în focar sunt: talina, vinculina, α -actinina, tensina și paxilina. Odată asamblat, complexul integrină-citoschelet funcționează similar cu receptorii activați și recrutează componenți ai sistemelor de semnalizare intracelulară [58]. Pe lângă rolul important în dezvoltarea embrionară și menținerea integrității țesuturilor adulte, integrinele reprezintă

principalele molecule capabile să recepționeze semnale extracelulare destinate unei bune funcționări celulare (de exemplu, inducția expresiilor unor gene) [58].

Expresia alterată a integrinelor determină modificări în adeziunea celulelor la matricea extracelulară și, implicit, crește abilitatea celulară de metastazare [58, 60, 61]. Literatura de specialitate raportează, în carcinomul colorectal, fie diminuarea expresiei integrinelor [62], fie alterarea expresiei lor (de exemplu, alterarea glicozilării, comparativ cu mucoasa colonică normală [63], care conduce la scăderea adezivității la laminină, collagen IV și fibronectină). Promovarea detașării celulelor tumorale din tumora primară și migrarea lor poate fi asociată cu o scădere în expresia integrinelor și corelată cu progresia tumorală [64]. Consecutiv acestor constatări, integrinele ar putea fi utilizate ca metodă precoce de tratament în metastazele hepatice secundare cancerului colorectal [65]. Datele obținute sunt rezultate în principal din studii experimentale, utilizând linii celulare tumorale [61, 66-69], existând puține studii realizate pe subiecți umani [64].

E-caderina

Caderinele [70] reprezintă o superfamilie de molecule glicoproteice, calciu-dependente și cu localizare transmembranară, specifice diferitelor tipuri de joncțiuni intercelulare de tip aderent și contribuind la menținerea organizării citoscheletale. Formează, prin interacțiuni homotipice, complexe cu moleculele intracitoplasmatiche numite catenine (α , β și γ), acestea din urmă fiind localizate sub membrana plasmatică și fixându-se pe filamentele de actină intracelulară [71].

După localizarea lor, au fost împărțite în două tipuri: caderine clasice și caderine desmozomale. Caderinele clasice au fost evidențiate în joncțiunile aderente, denumirile fiind în corelație cu celulele la care aparțin. Pentru țesutul epitelial este specifică E-caderina, cu rol de menținere a integrității straturilor epiteliale. Caderinele desmozomale sunt prezente în structura desmozomilor și sunt reprezentate de către desmogleine și desmocoline. Sunt codificate de gene identificate pe cromozomul 18 și sunt implicate în unele procese patologice de tip autoimun.

Dispariția E-caderinei conduce la pierderea structurii normale tisulare, rezultate din asamblarea celulelor și respectarea unei anumite polarități histoarhitectonice și, consecutiv, contribuie la procesele de carcinogeneză și metastazare [70]. Scăderea expresiei complexului de adeziune celulară E-caderină – alfa catenină facilitează desprinderea celulelor tumorale din tumora primară și este asociată cu un potențial metastatic crescut, diferențiere redusă și prognostic infaust [60, 70-75].

Datele din literatura de specialitate atestă că inhibarea expresiei E-caderinei este asociată cu dediferențierea, progresia și metastazarea cancerului colorectal [57, 70, 75-77], utilizarea anticorpilor anti-E-caderină blocând interacțiunea dintre celulelor tumorale colonice și favorizând invazia tumorală [78]. Gena APC (*eng.* Adenomatous Polyposis Coli) codifică, în statusul de normalitate, o proteină care se asociază cu cateninele și E-caderina, favorizând adeziunea. Mutațiile care afectează gena APC dezvoltate în polipoza adenomatoasă familială, în peste 60% din carcinoamele corectale sporadice și în uneori în adenoame, conduc, consecutiv, la pierderea acestei adeziuni, care se repercută în dinamica procesului de metastazare [79, 80].

Proteine imunoglobulin-like

Aceste molecule sunt încadrate în superfamilia imunoglobulinelor datorită organizării sub forma de bucle peptidice consolidate prin legături disulfidice și au rolul de a stabili adeziuni intercelulare calciu-independente, spre deosebire de celelalte clase, fără a implica structurile citoscheletale. Din această clasă fac parte câteva molecule de

adeziune cu localizare restrânsă la nivelul celulelor endoteliale: ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, implicate într-o etapă ulterioară a metastazării, prin facilitarea extravazării celulelor tumorale circulante [81], CEA și gena DCC.

CEA, descoperit în 1965 și utilizat ca marker tumoral clinic în carcinomul colorectal [82], este o moleculă de adeziune intercelulară homotipică, calciu-independentă, stabilizată prin legături fosfatidil-inozitol [83-85]. În mucoasa colonică normală, CEA este exprimat numai la nivelul domeniului apical [86, 87]. În celulele maligne din cancerul colorectal, CEA este exprimat pe toată suprafața celulară; adeziunea intercelulară fiind compromisă, rezultă alterarea histoarhitectoniei în teritoriul respective [86-88]. Prezența CEA facilitează, în schimb, în metastazele hepatice, adeziunea între celulele tumorale sau adeziunea cu celulele gazdei [86, 89].

La nivelul regiunii q21 a cromozomului 18 există o genă care codificată o proteină cu rol de moleculă de adeziune pentru celulele din mucoasa colonică [90]. Pierderea unei alele, cunoscută ca pierdere a heterozigozității (*eng.* Loss of Heterogeneity - LOH), conduce la pierderea proteinei respective, fiind raportată în peste 70% din carcinoamele colorectale [91, 92]. Consecutiv, gena implicată, membru al familiei de supergene imunoglobulinice, cu o omologie substanțială cu alte molecule de suprafață celulară, este denumită DCC și este considerată o genă tumorală supresor candidată [93]. DCC are nivele scăzute în mucoasa normală, prezența sa fiind asociată cu implicații prognostice [94, 95], datorită alterării interacțiunilor de adeziune celulă-celulă sau celulă-substrat în tumora primară, care facilitează procesul de metastazare [92, 93, 96-98].

3. DISTRUGEREA MEMBRANEI BAZALE ȘI INIȚIEREA INVAZIEI TUMORALE

Pentru a explica modul în care se realizează invazia tumorală în țesutul gazdă au fost propuse mai multe mecanisme, fiind luate în discuție rolul presiunii mecanice rezultate printr-o creștere tumorală rapidă, care poate orienta angajarea celulelor maligne de-a lungul planurilor tisulare de minimă rezistență [99], sau motilitatea celulară crescută care conduce la creșterea capacității de invazie [100]. Mecanismul cel mai larg acceptat este fundamentat pe degradarea membranei bazale și a matricei extracelulare, aceste structuri funcționând ca bariere între celulele epiteliale și stroma adiacentă [3, 101].

Membrana bazală [102] este o structură histologică specială constituită între țesutul epitelial și țesutul conjunctiv. Denumită și complex bazal datorită aspectului său ultrastructural care traduce o organizare mai complexă, este formată din trei lamine: lamina lucida, lamina densa – care formează lamina bazală – și lamina reticularis. Lamina bazală este sintetizată de celulele epiteliale, iar lamina reticularis – de țesutul conjunctiv.

Lamina lucida este o zonă aparent clară, de 45 nm grosime, în care apar condensări moderate în zonele corespunzătoare hemidesmozomilor. Acestea constau din filamente foarte fine, numite filamente de ancorare, care traversează lamina lucida. Din punct de vedere biochimic, la acest nivel au fost identificate glicoproteine (laminina, entactina, glicoproteina de membrană bazală), precum și proteine transmembranare din familia integrinelor care se proiectează din membrana celulelor epiteliale în lamina bazală. Lamina densa este un strat de material fin granular sau filamentos, de 50 nm grosime. Din punct de vedere biochimic lamina densa este formată din laminină și collagen tip IV, aranjate sub formă de “gard de plasă metalică” și înconjurate de

proteoglicani de tipul perlecanului; lanțurile laterale ale heparansulfatului, care se prelungesc din miezul proteic al perlecanului, au capacitatea de a forma polianioni și de a lega proteinele, limitând trecerea printre ele. Sunt prezente și componente extrinseci: fibronectină, entactină/nidogen, collagen tip V, molecule de adeziune din familia integrinelor. În lamina densa mai există inserate anse mici de fibrile bandate fin – fibrile de ancorare, formate din collagen tip VII, prin care trec fibrilele de collagen tip I și III din lamina reticularis. Se realizează astfel, prin această manieră de ancorare, un atașament flexibil. Lamina reticularis este formată din collagen tip I și III. Ea se interpune între membrana bazală și țesutul conjunctiv subjacent, grosimea ei variind în raport cu forțele care se exercită la nivel epitelial. Fibrile de collagen tip I și III fac anse în lamina reticularis. Ele interacționează și sunt legate la microfibrilele de fibrilină și la fibrilele de ancorare din lamina densa. Mai mult, grupările bazice ale fibrilelor de collagen formează legături cu grupările acide ale glicozaminoglicanilor din lamina densa, iar domeniile care leagă collagenul și domeniile pentru glicozaminoglicani ale fibronectinei facilitează și mai mult ancorarea laminei bazale de lamina reticularis.

Conform datelor din literatură, procesul de metastazare este strict dependent de capacitatea invazivă a celulelor tumorale din tumora primară, care acționează asupra structurii și/sau compoziției membranei bazale [103-105], distrugând-o, realizând inițial invazie locală și, ulterior, penetrare în sistemul vascular sanguin și/sau limfatic. Procesul de invazie este esențial pentru progresia tumorală, motiv pentru care evaluarea histopatologică a profunzimii de penetrare a tumorii este un element major în stadializare și tratament [3]. În mod concret, integrinele exprimate pe suprafața celulelor tumorale în cancerul colorectal [106,107] interacționează cu componente ale membranei bazale sau ale matricei extracelulare, această adeziune fiind recunoscută ca un pas critic în procesul de invazie. Dacă în statusul de normalitate fibroblastele, responsabile de sinteza collagenului IV, realizează împreună cu colonocitele o membrană bazală integră, pierderea interacțiunilor epitelio-mezenchimale în carcinogeneză determină un defect în producerea collagenului tip IV și afectarea membranei bazale, care conduce în mod direct la diseminarea celulelor tumorale [108].

Distrugerea membranei bazale poate rezulta și ca urmare a producerii insuficiente, sau datorită unei degradări enzimatică accelerată, în care sunt implicate metaloproteinazele. Metaloproteinazele (MMP) sunt enzime proteolitice zinc-dependente, caracterizate prin capacitatea de a degrada nu numai membrana bazală, ci și componente ale matricei extracelulare [109,110]. Există 6 clase principale de MMP: collagenaze, gelatinaze, stromelizine, matrilizine, MMP de tip membranar și alte MMP. Conform datelor din literatură, expresiile MMP-1 (colagenaza 1), MMP-13 (colagenaza 2), MMP 2 (gelatinaza A), MMP-9 (gelatinaza B), MMP-3 (stromelizina 1), MMP-10 (stromelizina 2), MMP-11 (stromelizina 3) și MMP-7 (matrilizina 1) sunt crescute în cancerule colorectale [2,109,111-117], fiind mai mari în cancerul colorectal invaziv, cu metastaze, comparative cu formele non-invazive, fără metastaze. Studii experimentale realizate pe linia de celule tumorale colonice SW620 au arătat că reducerea nivelului de matrilizina determină scăderea agresivității tumorale și, consecutiv, a metastazării la nivel hepatic [118]. Această constatare deschide perspective pentru un tip nou de tratament, dirijat împotriva metaloproteinazelor, inclusiv prin inhibitorilor tisulari endogeni (TIMP) sau produși sintetic (de exemplu batimastat / BB-94), a căror utilizare poate determina reducerea potențialului metastatic [109,110,117,119,120].

Alte enzime identificate în etapa de inițiere a invaziei tumorale sunt activatorul plasminogenului tip urokinază (uPA) – o serin-protează care acționează prin

transformarea plasminogenului în plasmină, care intervine în degradarea matricei extracelulare și activează alte proteaze [121-124], hialuronidaza – care degradează acidul hialuronic, proteoglican component ale matricei extracelulare [125-127] și trombospondina [128,129].

După depășirea membranei bazale, celulele maligne migrează, eveniment crucial deoarece permite accesul spre sistemul circulator. În aceste condiții se discută despre motilitatea celulară, stimulată prin intermediul unor citokine – de exemplu HGF (*eng.* Hepatocyte Growth Factor) și TGFbeta. HGF, considerat proteină prototip, este produs de hepatocite în cantități importante, contribuind la formarea metastazelor hepatice în carcinomul colorectal [130-132]. Expresia TGFbeta este semnificativ crescută la nivelul metastazelor, comparativ cu tumora primară sau mucoasa colonică normală, fiind astfel asociat cu fenotipul tumoral agresiv și metastatic [133].

4. SECHESTRAREA ȘI ADEZIUNEA CELULELOR METASTATICE TUMORALE ÎN ORGANELE ȚINTĂ

Celulele metastazante au o mare capacitate de coeziune, formând frecvent emboli tumorali. Acest fapt crește posibilitatea de sechestrare în microcirculația organelor țintă și, implicit, crește potențialul metastatic [3], secvența de evenimente implicând aderare inițial la endoteliu și ulterior la membrana bazală subendotelială și matricea extracelulară adiacentă, apoi extravazare și invazie în parenchimul adiacent. În această etapă, celulele tumorale care exprimă intens molecule de adeziune specifice au prioritate în metastazare [3].

Aderarea la endoteliul activat citokinic presupune cuplarea cu molecule de suprafață celulară din grupul selectinelor, lectine legate de acidul sialic [134-136]. Aici intervin liganzii oligozaharidici pentru E-selectină, structuri lactozaminice sialate, fucozilate, prezente pe glicoproteinele asociate celulelor tumorale din cancerul colonic [3,137,138]. Liganzii pentru E-selectină includ două antigene asociate cancerului de colon, denumite sialil-Lewis x (sialil-Le-x) [138,139] și sialil-Lewis a (sialil-Le-a) [140]. Din clasa moleculelor ce conțin sialil Le-x fac parte mucine asociate cancerului colorectal, membri ai familiei CEA, și glicoproteine de membrană lizozomală. Celulele metastazante din cancerul colonic exprimă puternic aceste molecule și, în consecință, pacienții cu metastaze prezintă nivele serice crescute de sialil-Lex [138,141] și CEA [83].

Date raportate în literatura de specialitate [2,3] relevă faptul că adeziunea poate fi inhibată prin anticorpi anti-E-selectină, mucine sintetizate (competitiv) de celulele tumorale, inhibitori ai glicozilării mucinelor sau prin substanțe cu efect anti-apoptoteine asociate mucinelor, sugerând astfel un alt tip de conduită terapeutică care ar putea fi dezvoltat.

Integrinele au și ele un rol important în adeziunea și detașarea dinamică a celulelor tumorale la endoteliu, în condițiile curgerii laminare a sîngelui în microcirculația organelor țintă [3,68].

Aderarea, distrugerea și depășirea membranei bazale subendoteliale se realizează prin mecanisme similare celor prezentate în contextul inițierii invaziei tumorale. Pentru cancerul colorectal, în etapa de populare a organelor țintă sunt implicate mai multe molecule: CEA, CD44, laminina. Modul în care fiecare dintre ele acționează constituie posibile mecanisme care pot explica dezvoltarea tumorilor secundare. Astfel, CEA ar interveni prin legarea sa homofilică de celulele tumorale cu CEA asociate ficatului [88], CD44 (și variantele sale) – prin stimularea celulelor

tumorale de a migra pe acidul hialuronic prezent în matricea extracelulară hepatică [142,143], iar laminina, prin stimularea adeziunii, creșterii și migrării celulare, precum și a sintezei de colagenază IV [144-148]. Blocarea acestor molecule reprezintă alte căi prin care specialiștii tentează oprirea procesului de metastazare. Dovezi concrete în acest sens rezultă, de exemplu, din faptul că administrarea experimentală de peptide sintetice similare unei zone din lanțul alfa al lamininei inhibă colonizarea hepatică, probabil printr-o competiție pentru receptorul lamininic [144].

Sechestrarea în organele țintă este dependentă și de modificările glicoproteinelor de suprafață celulară sintetizate de către celulele tumorale [149], în cadrul cărora sunt incluse galectina 3, membră a familiei de lectine endogene legate de B-galactozidă și sialil-Tn, un carbohidrat asociat mucinei. Sialil-Tn pare a avea rol în adeziunea celulelor metastazante la membrana bazală și în depășirea supravegherii imunologice [150,151]. Metastazele prezintă nivele crescute de galectină 3, comparativ cu tumorile primare, expresia sa corelându-se cu stadiile avansate Dukes și cu reducerea semnificativă a supraviețuirii pe termen lung [152-155]. Ca mecanism de acțiune, galectina aderă în manieră homotipică la celulele tumorale și determină creșterea adezivității acestora la endoteliu [156].

CONSIDERAȚII FINALE

Celulele metastatice sunt considerate celule competitive, înalt selecționate din ansamblul populației tumorale prezente la nivelul tumorii primare. Această selecție urmărește acele caracteristici de biologie celulară și moleculară care asigură capacitatea de a participa la etapele successive ale cascadei metastazării. Orientarea cercetărilor asupra mecanismelor intime, moleculare și genetice, ale carcinogenezei și, implicit, ale metastazării oferă, prin rezultatele concrete obținute, nu numai perspectiva înțelegerii procesului de transformare a normalului în malign, ci și a dezvoltării unei terapii țintite.

Mențiune: acest material a fost parțial susținut prin fondurile grantului CEEEX 122/2006.

BIBLIOGRAFIE

1. Majer M, Akerley W, Kuwada SK. Oncologists' current opinion on the treatment of colon carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7(5): 492-503
2. Bresalier RS. The biology of colorectal cancer metastasis. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25(4): 805-820
3. Portera CA Jr, Berman RS, Ellis LM. Molecular determinants of colon cancer metastasis. *Surgical Oncology* 1998; 7: 183-195
4. Berman RS, Portera CA Jr, Ellis LM. Biology of liver metastases. *Cancer Treat Res* 2001; 109: 183-206
5. Ahmad SA, Berman RS, Ellis LM. Biology of colorectal liver metastases. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12(1): 135-150
6. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679-695
7. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 221-247
8. Radinsky R, Ellis LM. Molecular determinants in the biology of liver metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 1996; 5(2):215-229
9. Takeda A, Stoeltzing O, Ahmad SA, Reinmuth N, Liu W, Parikh A, Fan F, Akagi M, Ellis LM. Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(7): 610-616
10. Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2005; 92(4): 347-359
11. Nadal C, Maurel J, Gascon P. Is there a genetic signature for liver metastasis in colorectal cancer? *World J Gastroenterol* 2007; 13(44): 5832-5844

12. Rmali KA, Puntis MCA, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2006; 9: 3–14
13. Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182–1186
14. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumours. *Ann Surg* 1972; 175: 409–416
15. Folkman J. The role of angiogenesis in tumour growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 65–71
16. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(3): 253-270
17. Ellis LM. Angiogenesis and its role in colorectal tumor and metastasis formation. *Semin Oncol* 2004; 31(6 Suppl 17): 3-9
18. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprosthetic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005; 46(5): 481-489
19. Khosravi Shahi P, Fernández Pineda I. Tumoral angiogenesis: review of the literature. *Cancer Invest* 2008; 26(1): 104-108
20. Bouck N. Tumour angiogenesis: the role of oncogenes and tumour suppressor genes. *Cancer Cells* 1990; 2: 179–185
21. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353–364
22. Ellis LM. A targeted approach for antiangiogenic therapy of metastatic human colon cancer. *Am Surg* 2003; 69(1): 3-10
23. Tomanek RJ, Schattman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000; 261(3): 126-135
24. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333(26): 1757-1763
25. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW. Genes expression in human tumour endothelium. *Science* 2000; 289: 1197–1201
26. Carson-Walter EB, Watkins DN, Nanda A, Vogelstein B, Kinzler KW, St Croix B. Cell surface tumour endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res* 2001; 61: 6649–6655
27. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Folkman J. Tumour vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1470–1478
28. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 15: 851–858
29. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989; 8: 3801–3806
30. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13: 18–32
31. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ, Cohen T, Gengrinovitch S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999; 13: 9–22
32. Shinkaruk S, Bayle M, Laín G, Délérís G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3(2): 95-117
33. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007; 102(6): 1358-1367
34. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991; 6: 1677–1683
35. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989–991
36. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1579–1586
37. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Bohlen P. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835–846

38. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290–298
39. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Cell Biol* 1998; 95: 548–553
40. Hu WG, Li JW, Feng B, Beveridge M, Yue F, Lu AG, Ma JJ, Wang ML, Guo Y, Jin XL, Zheng MH. Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur Surg Res* 2007; 39(4): 229-238
41. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: A critical review. *J Clin Pathol* 2008; doi:10.1136/jcp.2007.054858
42. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 41(4): 278-286
43. Abdou AG, Aiad H, Asaad N, Abd El-Wahed M, Serag El-Dien M. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18(4): 311-322
44. Weidner N. Intratumour microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9–19
45. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 69(4): 247-254
46. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964–3968
47. Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, Watson R, Begent RH. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol* 2005; 26(1): 1-8
48. Tokunaga T, Oshika Y, Abe Y, Ozeki Y, Sadahiro S, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 998–1002
49. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 2000; 5(Suppl. 1): 11–15
50. Takeda A, Shimada H, Imaseki H, Okazumi S, Natsume T, Suzuki T, Ochiai T. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in colorectal cancer patients: correlation with clinicopathological factors and tumour markers. *Oncol Rep* 2000; 7: 333–338
51. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 2004; 112(7-8): 496-507
52. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Ahmad SA, Jung YD, Fan F, Ellis LM. Angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2003; 10(7): 722-733
53. Whisenant J, Bergsland E. Anti-angiogenic strategies in gastrointestinal malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6(5): 411-421
54. Rennel ES, Hamdollah-Zadeh MA, Wheatley ER, Magnussen A, Schüller Y, Kelly SP, Finucane C, Ellison D, Cebe-Suarez S, Ballmer-Hofer K, Mather S, Stewart L, Bates DO, Harper SJ. Recombinant human VEGF(165)b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer* 2008; 44(13): 1883-1894
55. Goodin S. Development of monoclonal antibodies for the treatment of colorectal cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65(11 Suppl 4): S3-7
56. Agrez MV. Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg* 1996; 66(12): 791-798
57. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Ezumi K, Terayama M, Hemmi H, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Monden M. A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007; 95(8): 652-662
58. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775(1): 163-180
59. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(5): 495-507
60. Buda A, Pignatelli M. Cytoskeletal network in colon cancer: from genes to clinical application. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(5): 759-765

61. Enns A, Korb T, Schlüter K, Gassmann P, Spiegel HU, Senninger N, Mitjans F, Haier J. Alphavbeta5-integrins mediate early steps of metastasis formation. *Eur J Cancer* 2005; 41(7): 1065-1072
62. Stallmach A, Von Lampe B, Matthes H, Bornhöft G, Riecken EO. Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during benign to malignant tumor transformation. *Gut* 1992; 33(3): 342-346
63. Von Lampe B, Stallmach A, Riecken EO. Altered glycosylation of integrin adhesion molecules in colonectal cancer cells and decreased adhesion to extracellular matrix. *Gut* 1993; 34(6): 829-836
64. Yang GY, Xu KS, Pan ZQ, Zhang ZY, Mi YT, Wang JS, Chen R, Niu J. Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver. *Cancer Sci* 2008; 99(5): 879-887
65. Robertson JH, Iga AM, Sales KM, Winslet MC, Seifalian AM. Integrins: a method of early intervention in the treatment of colorectal liver metastases. *Curr Pharm Des* 2008; 14(3): 296-305
66. Yamada KM, Kennedy DW, Yamada SS, Gralnick H, Chen WT, Akiyama SK. Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res* 1990; 50(15): 4485-4496
67. Lehmann M, Rabenandrasana C, Tamura R, Lissitzky JC, Quaranta V, Pichon J, Marvaldi J. A monoclonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins alphavbeta3, alphavbeta5, and alphavbeta6. *Cancer Res* 1994; 54(8): 2102-2107
68. Haier J, Nasralla MY, Nicolson GL. Beta1-integrin-mediated dynamic adhesion of colon carcinoma cells to extracellular matrix under laminar flow. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(5): 377-387
69. van der Bij GJ, Oosterling SJ, Bögels M, Bhoelan F, Fluitsma DM, Beelen RH, Meijer S, van Egmond M. Blocking alpha2 integrins on rat CC531s colon carcinoma cells prevents operation-induced augmentation of liver metastases outgrowth. *Hepatology* 2008; 47(2): 532-543
70. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst* 2008; 4(8): 835-850
71. Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* 2004; 26(5): 497-511
72. Raftopoulos I, Davaris P, Karatzas G, Karayannacos P, Kouraklis G. Level of a-catenin expression in colorectal cancer correlates with invasiveness, metastatic potential and survival. *J Surg Oncol* 1998; 68: 92-99
73. Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Matsui S, Tsukita S, Kikkawa N, Monden M. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(1): 29-37
74. Hiscox S, Jiang WG. Expression of E-Cadherin, alpha, beta and gamma-catenin in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 1349-1354
75. Truant SC, Gouyer VP, Leteurtre EA, Zerimech F, Huet GM, Pruvot FR. E-Cadherin and beta-catenin mRNA levels throughout colon cancer progression. *J Surg Res* 2008; Epub ahead of print
76. Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R, Northover JM, Hart IR. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1993; 142(4): 981-986
77. Delektorskaya VV, Perevoshchikov AG, Golovkov DA, Kushlinskii NE. Expression of E-cadherin, beta-catenin, and CD-44v6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2005; 139(6): 706-710
78. Kinsella AR, Lepts GC, Hill CR, Jones M. Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin Exp Metast* 1994; 12: 335-342
79. Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol* 2007; 40(2): 68-81
80. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 19): 3327-3335
81. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem* 2007; 14(4): 377-386
82. Gold P, Freedman S. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-462

83. 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(2): 327-334
84. Maxwell P. Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker. *Br J Biomed Sci* 1999; 56(3): 209-214
85. Téllez-Avila FI, García-Osogobio SM. The carcinoembryonic antigen: apropos of an old friend. *Rev Invest Clin* 2005; 57(6): 814-819
86. Ishi S, Steele G, Ford R, Paliotti G, Thomas P, Andrews C, Hansen HJ, Goldenberg DM, Jessup JM. Normal colonic epithelium adheres to carcinoembryonic antigen and type IV collagen. *Gastroenterology* 1994; 106(5): 1242-1250
87. Ogura E, Senzaki H, Yoshizawa K, Hioki K, Tsubura A. Immunohistochemical localization of epithelial glycoprotein EGP-2 and carcinoembryonic antigen in normal colonic mucosa and colorectal tumors. *Anticancer Res* 1998; 18(5B): 3669-3675
88. Hostetler RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi KF, Fan D, Toth C, Thomas P, Jessup JM. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 380-385
89. Jessup JM, Petrick AT, Toth CA, Ford R, Meterissian S, O'Hara CJ, Steele G Jr, Thomas P. Carcinoembryonic antigen: enhancement of liver colonisation through retention of human colorectal carcinoma cells. *Brit J Cancer* 1993; 67(3): 464-470
90. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene which is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247(4938): 49-56
91. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989; 261(21): 3099-3103
92. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331(4): 213-221
93. Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, Hedge P, Silverman GA, Vogelstein B. The DCC gene: Structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 1994; 19:525
94. Aoyama N, Minami R, Fujimori T, Maeda S. Structure and function of DCC (deleted in colorectal cancer) gene and its product. *Nippon Rinsho* 1996; 54(4): 972-980
95. Gal R, Sadikov E, Sulkes J, Klein B, Koren R. Deleted in colorectal cancer protein expression as a possible predictor of response to adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(7): 1216-1224
96. Saito M, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T, Shiku H, Furukawa K. Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology* 1999; 56(2): 134-141
97. Tarafa G, Villanueva A, Farré L, Rodríguez J, Musulén E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capellá G. DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene* 2000; 19(4): 546-555
98. Aschele C, Debernardis D, Lonardi S, Bandelloni R, Casazza S, Monfardini S, Gallo L. Deleted in colon cancer protein expression in colorectal cancer metastases: a major predictor of survival in patients with unresectable metastatic disease receiving palliative fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22(18): 3758-3765
99. Gabbert H. Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev* 1985; 4(4): 293-309
100. Gutman M, Fidler IJ. Biology of human colon cancer metastasis. *World J Surg* 1995; 19(2): 226-234
101. Nerenberg PS, Salsas-Escat R, Stultz CM. Collagen - a necessary accomplice in the metastatic process. *Cancer Genomics Proteomics* 2007; 4(5): 319-328
102. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232(9): 1121-1129
103. Burtin P, Chavenel G, Fodart JM, Martin E. Antigens of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: an immunofluorescence study. *Int J Cancer* 1982; 30(1):13-20

104. Pujuguet P, Hammann A, Martin F, Martin M. Abnormal basement membrane in tumors induced by rat colon cancer cells. *Gastroenterology* 1994; 107(3): 701-711
105. Kleinman HK, Jacob K. Invasion assays. *Curr Protoc Cell Biol* 2001; Chapter 12: Unit 12.2.
106. Hemler ME, Crouse C, Sonnenberg A. Association of the VLA alpha 6 subunit with a novel protein. A possible alternative to the common VLA beta 1 subunit on certain cell lines. *J Biol Chem* 1989; 264(11): 6529-6535
107. Koretz K, Schlag P, Boumsell L, Moller P. Expression of VLAalpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol* 1991; 138(3): 741-750
108. Martin M, Pujuguet P, Martin F. Role of stromal myofibroblasts infiltrating colon cancer in tumor invasion. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 712-717
109. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colorectal carcinomas. *In Vivo* 2000; 14(5): 659-666
110. Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2): 119-135
111. Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51(1): 439-444
112. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992; 14(7): 455-463
113. Matrisian LM, Wright J, Newell K, Witty JP. Matrix-degrading metalloproteinases in tumor progression. *Princess Takamatsu Symp* 1994; 24: 152-161
114. Masaki T, Sugiyama M, Matsuoka H, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y. Coexpression of matrilysin and laminin-5 gamma2 chain may contribute to tumor cell migration in colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2003; 48(7): 1262-1267
115. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Goto A, Sakamoto A, Atomi Y. Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2001; 84(10): 1317-1321
116. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1705(2): 69-89
117. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2): 101-117
118. Witty JP, McDonnell S, Newell KJ, Cannon P, Navre M, Tressler RJ, Matrisian LM. Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 1994; 54(17): 4805-4812
119. Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon cancer growth and spread in a patient-like or orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 1994; 54(17): 4726-4728
120. Watson SA, Morris TM, Robinson G, Crimmin MJ, Brown PD, Hardcastle JD. Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Res* 1995; 55: 3629-3633
121. Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139-266
122. deBruin PA, Griffioen G, Verspaget HW, Verheijen JH, Dooijewaard G, van den Ingh HF, Lamers CB. Plasminogen activator profiles in neoplastic tissues of the human colon. *Cancer Res* 1988; 48(16): 4520-4524
123. Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg* 2002; 26(7): 767-771
124. Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, Rømer J. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* 2005; 93(4): 676-681
125. Csoka TB, Frost GI, Stern R. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion Metastasis* 1997; 17: 297-311
126. Laurich C, Wheeler MA, Iida J, Neudauer CL, McCarthy JB, Bullard KM. Hyaluronan mediates adhesion of metastatic colon carcinoma cells. *J Surg Res* 2004; 122(1): 70-74
127. Stern R. Hyaluronidases in cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2008; 18(4): 275-280
128. Yamashita Y, Kurohiji T, Tuszynski GP, Sakai T, Shirakusa T. Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 82(4): 632-638
129. Sargiannidou I, Qiu C, Tuszynski GP. Mechanisms of thrombospondin-1-mediated metastasis and angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(1): 127-136

130. To CTT, Tsao MS. The roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and Met receptor in human cancers. *Oncol Rep* 1998; 5: 1013-1024
131. Hiscox SE, Hallett MB, Puntis MC, Nakamura T, Jiang WG. Expression of the HGF/SF receptor, c-met, and its ligand in human colorectal cancers. *Cancer Invest* 1997; 15(6): 513-521
132. Fujita S, Sugano K. Expression of c-met proto-oncogene in primary colorectal cancer and liver metastases. *Jap J Clin Oncol* 1997; 27(6): 378-383
133. Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman E. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor beta1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 497-504
134. Varki A. Selectins and other mammalian sialic acid binding lectins. *Cum Opin Cell Biol* 1992; 4: 257
135. Gout S, Tremblay PL, Huot J. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(3): 253-270
136. Witz IP. The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(1): 19-30
137. Kaila N, Thomas BE 4th. Design and synthesis of sialyl Lewis(x) mimics as E- and P-selectin inhibitors. *Med Res Rev* 2002; 22(6): 566-601
138. Hanski C, Hanski ML, Zimmer T, et al. Characterization of the major sialyl-Lex- positive much present in colon, colon carcinoma, and sera of patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 928
139. Kannagi R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj J* 2004; 20(5): 353-364
140. Kannagi R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 2007; 30(3): 189-209
141. Hoff SD, Matsushita Y, Ota DM, Cleary KR, Yamori T, Hakomori S, Irimura T. Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1989; 49(24 Pt 1): 6883-6888
142. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 1993; 341: 725-726
143. Yamaguchi A. Expression of variant CD44 in colorectal cancer and its relationship to liver metastasis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1998; 99(7): 409-414
144. Bresalier RS, Schwartz B, Kim YS, Duh QY, Kleinman HK, Sullam PM. The laminin alpha 1 chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55(11): 2476-2480
145. Mafune KI, Ravikumar TS, Wong JM, Yow H, Chen LB, Steele GD Jr. Expression of a Mr 32,000 laminin binding protein messenger RNA in human colon carcinoma correlates with disease progression. *Cancer Res* 1990; 50(13): 3888-3891
146. Lenander C, Habermann JK, Ost A, Nilsson B, Schimmelpenninck H, Tryggvason K, Auer G. Laminin-5 gamma 2 chain expression correlates with unfavorable prognosis in colon carcinomas. *Anal Cell Pathol* 2001; 22(4): 201-209
147. Aoki S, Nakanishi Y, Akimoto S, Moriya Y, Yoshimura K, Kitajima M, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of 103 cases. *Dis Colon Rectum* 2002; 45(11): 1520-1527
148. Masaki T, Matsuoka H, Sugiyama M, Abe N, Izumisato Y, Sakamoto A, Atomi Y. Laminin-5 gamma2 chain expression as a possible determinant of tumor aggressiveness in T1 colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 2003; 48(2): 272-278
149. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2): 77-99
150. Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* 1996; 110(5):1354-1367
151. Ogata S, Ho I, Maklansky J, Chen A, Werther JL, Reddish M, Longenecker BM, Sigurdson E, Iishi S, Zhang JY, Itzkowitz SH. A rat model to study the role of STn antigen in colon cancer. *Glycoconj J* 2001; 18(11-12): 871-882
152. Schoeppner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS. Expression of an endogenous galactose binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer* 1995; 75(12): 2818-2826

153. Nakamura M, Inufusa H, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Nakajima A, Hida JI, Miyake M, Shindo K, Yasutomi M. Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. *Int J Oncol* 1999; 15(1): 143-148
154. Nagy N, Legendre H, Engels O, André S, Kaltner H, Wasano K, Zick Y, Pector JC, Decaestecker C, Gabius HJ, Salmon I, Kiss R. Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting. *Cancer* 2003; 97(8): 1849-1858
155. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, Watanabe A, Nakashima H, Baba H, Maehara Y. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2005; 25(4): 3117-3121
156. Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hilken J, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem* 2007; 282(1): 773-781