

# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

## **TESIS DOCTORAL:**

Cáncer de colon experimental: Caracterización del modelo  
mediante marcadores tumorales y moléculas de adhesión

### **DOCTORANDO**

**Fernando Roux Carmona**

### **DIRECTORES**

**Dr. D. Jacinto García García**

**Dr. D. Francisco Javier García Criado**

**Salamanca, 2009**

**Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria, Director del Departamento de Cirugía.  
Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.**

**CERTIFICA:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Cáncer de colon experimental: Caracterización del modelo mediante marcadores tumorales y moléculas de adhesión**”, ha sido realizada por D. Fernando Roux Carmona, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por esta Universidad, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca, a cinco de octubre de dos mil nueve.

Fdo.: Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria.  
Director del Departamento de Cirugía

**Prof. Dr. D. Jacinto García García. Profesor Titular de Cirugía. Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.**

**Prof. Dr. D. Francisco Javier García Criado. Profesor Titular de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.**

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Cáncer de colon experimental: Caracterización del modelo mediante marcadores tumorales y moléculas de adhesión**”, presentada por D. Fernando Roux Carmona, para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante un Tribunal.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca, a cinco de octubre de dos mil nueve.

**Prof. Dr. D. J. García García**  
**DIRECTOR DE TESIS**

**Prof. Dr. D. F. J. García Criado**  
**DIRECTOR DE TESIS**

**AGRADECIMIENTOS:**

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar quiero manifestar mi gratitud a los Profesores Dr. D. Jacinto García García y Dr. D. Francisco Javier García Criado, Directores de esta Tesis Doctoral, por su total disponibilidad y por todas las facilidades ofrecidas.

Al Departamento de Cirugía y particularmente a su anterior Director, el Prof. Dr. D. Alberto Gómez Alonso por todas las facilidades obtenidas y los medios prestados. Muy especialmente al Profesor Dr. D. Jacinto García García que con tanta paciencia me ha orientado en la investigación y sin cuya dedicación y entusiasmo no hubiera sido posible esta Tesis Doctoral. A los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca y de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de Salamanca donde generosamente nos ayudaron con algunas técnicas presentadas en este trabajo.

Al equipo de trabajo que ha participado en el desarrollo del proyecto:

Dr. D. Francisco Javier García Criado

Dr. D. Pablo Rodríguez Barca

Dra. Dña. María Begoña García Cenador

Dra. Dña. María Luisa Martín Rodero

Dra. Dña. Dolores Ludueña de la Cruz

Quiero agradecer a mi familia y amigos su paciencia y su ánimo para continuar mi labor investigadora. A mi madre (q.e.p.d.) que le hubiera gustado verme concluir este trabajo.

Y finalmente doy las gracias a todas aquellas personas que me han ayudado, de forma anónima y desinteresada, en la realización y la consecución de esta Tesis Doctoral.

A MI FAMILIA  
A LA MEMORIA DE MI MADRE

## **ABREVIATURAS:**

ADC: Adenocarcinoma

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

AOM: Azoximetano

ASO: Anión superóxido

CAMs: Moléculas de adhesión celular

CCR: Cáncer colorrectal

CEA: Antígeno carcinoembrionario

Células NK: células natural killer

DMH: Dimetilhidrazina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

GFP: Green Fluorescent Protein

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Agua oxigenada

HNPPC: Cáncer de Colon Hereditario No Polipoideo

IHQ: Inmunohistoquímica

Knk: Ratón Knockout

Min: Neoplasia intestinal múltiple

MMR: Genes reparadores del DNA

MNNG: N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanina

MNU: N-metil-N-nitrosourea

MSI: Microsatélites

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: Radical superóxido

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar

RLO: Radicales libres de oxígeno

SCDI: Ratones con inmunodeficiencia combinada

SOD: Superóxido Dismutasa

SOI: Implantación ortotópica quirúrgica

TNF: Factor de necrosis tumoral

**INDICE:**

	<b>Página</b>
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ESTADO ACTUAL DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE COLON	14
1. Modelos experimentales de cáncer de colon	15
1.1.- Modelos in vitro: Líneas celulares procedentes de tumores humanos o de ratones	16
1.2.-Modelos in vivo:	16
1.2.1.-Según el tipo de animal	16
1.2.1.1- Animal íntegro	
1.2.1.2- Animal inmunodeprimido	
1.2.1.3- Animal modificado genéticamente	
1.2.2.-Según el mecanismo de producción	17
1.2.2.1-Inducidos:	
1.2.2.1.1- Carcinogénesis inducida por sustancias químicas	
1.2.2.1.2- Carcinogénesis inducida por traumatismos	
1.2.2.1.3- Carcinogénesis inducida por maniobras quirúrgicas	
1.2.2.2- Implantados:	
1.2.2.2.1- Según el material implantado	
1.2.2.2.1.1- Líneas celulares obtenidas de tumor humano o singénico	
1.2.2.2.1.2- Células tumorales aisladas de ratón	
1.2.2.2.1.3- Fragmentos de tejido neoplásico	
1.2.2.2.2- Según el lugar de implantación	
1.2.2.2.2.1- Ortotópico	
1.2.2.2.2.2- Heterotópico	

2. Biología del cáncer de colon	26
2.1.- Alteraciones en el material genético	
2.1.1- Actuación modificando la vía mutadora	
2.1.2- Actuación modificando la vía reparadora	
2.1.3- Modelos para provocación de metástasis hepáticas	
3. Evaluación del crecimiento tumoral y de las metástasis	32
4. Elección del modelo en relación con el aspecto del cáncer colorrectal estudiado	35
4.1- Historia natural	
4.2- Quimioterapia	
4.3- Resección quirúrgica, escisión local, recurrencia	
III. ESTADO ACTUAL DE LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL	38
1. Alteraciones en el material genético	40
2. Moléculas de Adhesión Celular (CAMs)	44
2.1- Familias de CAMs	
2.1.1- Cadherinas	
2.1.2- Superfamilia inmunoglobulinas	
2.1.3- Integrinas	
2.1.4- Selectinas o LEC-CAMs	
2.1.5- Proteoglicanos	
3. Antígeno Carcinoembrionario	52
4. Citocinas	54
5. Radicales libres del Oxígeno	57
6. Patogénesis del crecimiento tumoral	59
7. Mecanismo de proliferación e invasión local	61
8. Angiogénesis	64
9. Metástasis	66
9.1- linfáticas	
9.2- Vía hematológica	
9.3- Por extensión directa	
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	69



V. MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. Generalidades	73
1.1- Lugar de realización	
1.2- Animal de experimentación	
2. Plan general	77
2.1- Cuidado y manipulación de los animales	77
2.2- Estudios preliminares	78
2.3- Procedimiento para la realización de implantes tumorales	79
2.3.1- Anestesia	
2.3.2- Procedimiento quirúrgico	
2.4- Seguimiento y controles postoperatorios	82
2.5- Obtención de muestras de tumor humano para implante	83
2.6- Sacrificio y toma de muestras del tumor desarrollado en el ratón	84
2.7- Estudio morfológico – Técnica de IHQ	85
2.7.1- Determinación de las CAMs por Western Blot	
2.7.1.1- Extracción de proteínas	
2.7.1.2- Cuantificación de proteínas	
2.7.1.3- Determinación de la expresión de proteínas	
2.7.2- Determinación del ritmo de producción del anión superóxido	
2.7.3- Determinación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$	
2.7.4- Análisis de los datos	
VI. RESULTADOS	94
1. Análisis bibliográfico	95
2. Resultados de la implantación y supervivencia	97
3. Resultados del estudio histológico y del análisis por IHQ	99
4. Resultados de la determinación de las CAMs	110
5. Resultados de la determinación de ASO	116
6. Resultados de la determinación de TNF	117

VII. DISCUSIÓN	118
1. Discusión de los modelos de provocación de CCR experimental	119
1.1- Consideraciones generales sobre el uso de animales para modelos experimentales de CCR	
1.1.1- Modelos de CCR espontáneos e inducidos químicamente	
1.1.2- Modelos experimentales inducidos en animales modificados genéticamente	
1.2- Modelos de implantación	
1.3- Modelos tumorales ectópicos y ortotópicos	
1.4- Modelos para la formación de metástasis hepáticas	
1.5- Ventajas, limitaciones y aplicaciones de los modelos de implantación	
2. Discusión del diseño experimental utilizado	135
3. Discusión de los datos de IHQ	137
4. Discusión de los resultados de la medición del ASO	140
5. Discusión de las citoquinas y CAMs	143
VIII. CONCLUSIONES	146
IX. BIBLIOGRAFÍA	148

## **I. INTRODUCCIÓN**

El Cáncer Colorrectal (CCR) es el más común en el tubo digestivo, es el segundo tumor más frecuente en los países occidentales, tras el cáncer de mama en las mujeres y el de pulmón en los hombres [1, 2] y es la segunda causa de muerte en el mundo occidental.

Cada año se diagnostican en el mundo 570.000 nuevos casos de CCR [3]. Más de la mitad (300.000) en Europa y en EEUU, donde da lugar a unas 200.000 muertes anuales. Al menos un tercio de los adultos de la población industrializada desarrolla un adenoma de colon, pero sólo un 10% progresa a carcinoma invasivo [4]. La prevalencia muestra una amplia variación geográfica, con mayor incidencia en Asia y África (donde el 10-15% de los adultos tienen uno o más adenomas) [3].

En España su incidencia es de 20-30 casos por cada 100.000 habitantes y año, y con una mortalidad del 20% de las muertes por neoplasias [5]. Causó el 11% de las defunciones por cáncer en el hombre y el 15% en las mujeres, se estima que el número de nuevos casos es de 20.000 en ambos sexos, frente a 11.900 defunciones, según datos del año 2000 [6].

Las posibilidades de inducir un CCR en animales de experimentación se vienen desarrollando desde 1941 en el que Lorenz y Stewart [7] usaron en ratones dibenzanthracene o methylcholanthrene creando múltiples cánceres intestinales pequeños.

Desde entonces, los modelos experimentales se han ido desarrollando en modelos in vivo, modelos in vitro, modelos genéticos, etc. Es posible transplantar material tumoral desde una variedad de tipos tumorales al sitio apropiado anatómico y su desarrollo de metástasis de forma y localización similar a muchos tipos de tumores de cáncer humano, que intentan profundizar en nuestro conocimiento acerca de aspectos tan dispares como la carcinogénesis, respuesta a drogas, formación de metástasis, etc. [8]

El uso de modelos animales a partir de CCR humano puede permitir una mejor comprensión de los mecanismos de su desarrollo y patogénesis [9, 10].

El modelo animal ideal debe replicar fielmente todos los aspectos del tumor desarrollado en el hombre. Esto incluye la adquisición de alteración genética con los cambios subsiguientes en comportamiento celular y biología tumoral. Debe añadirse el potencial de provocación de metástasis e idealmente conservarse la característica de sensibilidad a la terapéutica [11]. Además, el modelo tumoral debe ser práctico: el tumor tomado debe ser predecible y consistente, con una alta incidencia de afectación en animales en un estrecho margen de tiempo [12]. Desdichadamente, aunque los modelos aproximan algo de las características del CCR humano, ninguno de los modelos reúne todos estos criterios. Por tanto, para cada cuestión experimental específica que deba ser estudiada, se debe elegir el mejor modelo adecuado para resolver esa cuestión en particular.

En el presente trabajo se hace un análisis exhaustivo de los distintos modelos experimentales, con sus ventajas e inconvenientes.

## **II. ESTADO ACTUAL DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE COLON**

## **1. Modelos experimentales de CCR**

El uso de modelos experimentales de CCR continúa siendo imprescindible en muchos aspectos de la investigación en el momento actual [8, 13].

Como ya se ha dicho anteriormente, el modelo experimental ideal debería poder replicar fielmente todos los aspectos del tumor desarrollado en el hombre [12]. Sin embargo, ninguno de los modelos es capaz de semejar todas las características del CCR humano.

Por tanto, para cada cuestión experimental específica que deba ser estudiada, se debe elegir el mejor modelo adecuado [14].

A continuación se irán revisando los diferentes modelos experimentales utilizados con sus características más importantes.

## 1.1- Modelos in Vitro: líneas celulares procedentes de tumores humanos o de ratones

### 1.1.1- Cultivos celulares

Los primeros modelos utilizados se consiguieron sometiendo a líneas celulares de colon de hámster a agentes carcinogénicos [15].

Sin duda los modelos más utilizados son obtenidos de líneas celulares procedentes de CCR humano (HT-29, LoVo, SW620) [16] o de líneas celulares obtenidas a expensas de CCR inducido químicamente en el animal de experimentación (CT26, WB2054) [17].

La utilización de células obtenidas por pases en cultivos celulares permite disponer de un material homogéneo y en cantidades ilimitadas, pero hay que tener en cuenta que pueden no reflejar exactamente el tumor original ya que los sucesivos pases han podido actuar seleccionando determinados clones [18].

Estos modelos, bien utilizados in vitro (sobre el cultivo celular) o mediante inoculación de las líneas celulares ortotópica o heterotópicamente a animales normales o inmunodeprimidos [16] tienen una aplicación particular para el estudio de nuevas estrategias de quimioterapia e inmunoterapia (incluyendo la resistencia a drogas) y en la evaluación de la terapia genética [19].

## 1.2- Modelos in Vivo

### 1.2.1- Según el tipo de animal

#### 1.2.1.1- En animal integro

La formación espontánea de CCR en ratones ocurre con una incidencia menor al 1% [20, 21], por lo que no son adecuados para realizar estudios experimentales de desarrollo de CCR. Aunque se realicen en ratones



propensos a desarrollar CCR, la enfermedad aparece en edades avanzadas y la predictibilidad y reproductibilidad del tumor es insuficiente para el uso experimental. Por otro lado, en esos ratones la formación de metástasis ocurre sólo espontáneamente.

#### 1.2.1.2- En animal inmunodeprimido

En los ratones desnudos el gen Nu está eliminado, resultando ratones que no tienen pelo y sin timo, por lo que no pueden generar linfocitos T.

#### 1.2.1.3- En animal modificado genéticamente

Los ratones inunmunodeprimidos (SCID) tiene una alteración de la maduración de linfocitos y un déficit en la circulación, la maduración y la función de células T y B [22]. En contraste con su carencia de adaptación inmunológica, los ratones SCID poseen un sistema inmune innato completamente intacto, con un número normal de macrófagos, células natural killer (células NK) y granulocitos.

### 1.2.2- Según el mecanismo de producción

#### 1.2.2.1- Inducidos

##### 1.2.1.1.1- Carcinogénesis inducida por sustancias químicas

Se conocen diversas sustancias que administradas vía oral, parenteral o rectal son capaces de provocar CCR en animales de experimentación.

Los carcinógenos más frecuentemente usados son Dimetilhidrazina (DMH) y sus metabolitos N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanina (MNNG), N-metil-N-nitrosourea (MNU) [23] y Azoximetano (AOM).

La DMH puede ser administrada por vía oral, subcutánea, intrarrectal e intramuscular con resultados variables [23]. La administración intrarrectal

induce una rápida hiperplasia y lesiones preneoplásicas en el colon tras 34 semanas, mientras que cuando se administra vía oral la incidencia tumoral es baja (del 14 al 30%). Los resultados de la administración subcutánea de DMH son muy variables (incidencia tumoral desde el 0 al 100%) [14].

La administración de MNU por vía oral induce la aparición de tumores a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, con una disminución de la incidencia desde el estómago al recto. En cambio, cuando se administra intrarrectal produce tumor en el colon en el 100% de los casos. Por otra parte, se desarrollaron metástasis en un 23 a 31% de los ratones [24].

El AOM puede ser administrado tanto vía subcutánea como intraperitoneal mediante inyecciones semanales de 7 a 15 mg/kg de peso durante 10 a 12 semanas en ratas o ratones de varias edades [25]. El intervalo de latencia es aproximadamente de cuatro semanas [26]. Este es un modelo simple, reproducible y efectivo y es extensamente utilizado [27]. Una única inyección de AOM en ratas de 1 día de edad produjo, relativamente, más neuroblastomas y menos tumores de colon comparando con una única inyección a animales de 60 días de edad [28]. Con altas dosis de AOM (15 mg/kg/semana) ocurrieron predominantemente neoplasias en el colon izquierdo, mientras que con dosis bajas (7 mg/kg/semana) el colon derecho se afecta más frecuentemente [29]. Estudios genéticos han demostrado que produce un cáncer con baja inestabilidad de microsatélites [30].

Un gran inconveniente del CCR inducido por carcinógenos es la baja incidencia de tumor, por lo que en general deben usarse muchos animales.

La incidencia de desarrollo de CCR depende, por lo tanto, del carcinógeno utilizado, la dosis administrada, la duración del tratamiento y la frecuencia de administración, así como la vía y forma de administración [14].

La flora intestinal, la dieta y el estado inmunológico de los ratones pueden interferir con el metabolismo de los compuestos carcinogénicos y de ese modo influir en su concentración local efectiva [31].

Además, otros factores como el sexo, la edad y el contexto genético de los ratones afectan a la incidencia del desarrollo del CCR.

Los cánceres inducidos por carcinógenos, aunque proporcionan un buen modelo de cáncer local y comparten muchas características histológicas con los cánceres humanos, tienen una historia natural diferente [32] y no son adecuados para estudiar la formación de metástasis, pues éstas tardan mucho en desarrollarse y se dan con poca frecuencia. Sin embargo, este modelo es ideal para estudiar algunos aspectos, tales como la influencia de la dieta en el desarrollo tumoral [33].

Desde hace años se sabe que ciertas sales biliares son cancerígenas [34] ya que la inyección de ácido apocólico y deoxicólico a ratas causaron sarcomas en el lugar de la inyección [35]. La posibilidad de que tales ácidos biliares pudieran actuar como co-carcinógenos intraluminales ha sido probada en distintos modelos experimentales [36, 37]. La conclusión de estos estudios, es que sólo los animales en los que se asoció un agente carcinógeno a los ácidos biliares desarrollaron cuatro veces más número de pólipos, pero el mismo número de cánceres. La instilación solamente de ácidos biliares no tuvo ningún efecto [38, 39].

#### 1.2.1.1.2- Carcinogénesis inducida por traumatismos

Es conocido que el CCR humano ocurre, más frecuentemente, en determinadas situaciones que suponen una inflamación o irritación crónica de la zona [40], como ocurre en los pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn [41, 42]. Este fenómeno puede ser análogo al incremento de CCR humanos en líneas de sutura [43].

Sin embargo, esta lesión puede ser sólo un promotor y no ser la causante del cáncer por sí misma en ausencia de un carcinógeno.

Basándose en estas observaciones, se ha intentado producir modelos experimentales de CCR en ratas sometidas a diversos procedimientos quirúrgicos y tratadas con inductores químicos.

La inflamación crónica de la mucosa del colon con dextransulfato favorece la producción de tumores inducida por AOM [44] y por instilación de líneas celulares neoplásicas [45].

La incidencia de tumores cecales tras la administración de DMH fue tres veces más frecuente en animales con exclusión cecal, y la mayoría de los tumores aparecieron alrededor de la línea de sutura.

La administración de AOM en animales a los que se había realizado una anastomosis a 9 cms del ano [46] provocó un incremento tumoral en el lugar de la anastomosis y en la región distal del intestino, en comparación con el intestino proximal o ciego.

Se ha publicado la aparición de CCR alrededor de la línea de sutura o estomas de colostomía en ratas tratadas con DMH [47, 48], MNNG [49] y AOM [50].

El tipo de material de sutura utilizado en la confección de la anastomosis también influye en la aparición de cáncer. En un modelo de roedor al que le fue inyectada subcutáneamente DMH (20 mg/Kg todas las semanas durante 28 semanas, empezando 2 meses tras la operación) los tumores de la anastomosis aparecían con más frecuencia en las anastomosis realizadas con alambre que en las realizadas con seda [51].

### 1.2.1.1.3- Carcinogénesis inducida por maniobras quirúrgicas

Un tipo particular de traumatismo lo constituye la intervención quirúrgica. Las condiciones fisiopatológicas que se derivan de determinadas intervenciones quirúrgicas también han sido estudiadas como causa de inducción de tumores en animales, si bien con resultados no concluyentes. La cirugía de úlcera péptica puede predisponer a los pacientes intervenidos al consiguiente desarrollo de CCR [52]. Se estudió el efecto de la vagotomía y piloroplastia o gastrectomía parcial tipo Polya en ratas hembras Sprague-Dawley tratadas con AOM (a dosis total de 60 mg/kg). Aunque la vagotomía y la piloroplastia incrementan la producción de las células de la cripta cecal, no aparecía esta alteración de producción de tumor tras una operación. La gastrectomía parcial de Polya parece ejercer un efecto protector, probablemente por inhibición de la proliferación celular de colon [53].

La resección del intestino delgado estimula la carcinogénesis colorrectal experimental, posiblemente estimulando la proliferación de células epiteliales [54]. Rainey y colaboradores [55, 56], trataron ratas hembras Sprague-Dawley con dosis entre 100-125 gr de AOM durante 6 semanas, con una dosis total de 90 mg/kg por vía intraperitoneal, tras haber realizado una resección o un bypass del 33% de intestino delgado distal. La resección intestinal tiene un mayor efecto que el bypass (55% el CCR vs 32%), probablemente por producción temprana de hiperplasia [56-58].

En cambio el intestino grueso muestra una limitada adaptación tras la resección parcial y no parece tener riesgo creciente de carcinogénesis, excepto en la línea de sutura [59, 60].

### 1.2.2.2- Implantados

#### 1.2.2.2.1- Según el material implantado

##### 1.2.2.2.1.1- Modelos obtenidos por implante de células tumorales

Injertos tumorales procedentes de cualquier tejido humano (xenoinjerto) o de ratón (aloinjerto) pueden ser implantados en ratones receptores. Para prevenir el rechazo del xenoinjerto, se utilizan ratones desnudos o con marcada inmunodeficiencia combinada (SCID).

Dentro de este modelo existen varias posibilidades atendiendo al lugar de implantación (ortotópico y heterotópico) y al material implantado (líneas celulares o células tumorales aisladas o tejido tumoral íntegro) y a las combinaciones de ambos (Tabla I).

Material implantado	Método de implantación
Líneas celulares o suspensión de células tumorales	Inyección ectópica (subcutánea) Inyección ortotópica en el colon, ciego o pared de recto Inyección transesplénica Inyección intraperitoneal Inyección dentro de un conducto sanguíneo específico, usualmente vena porta
Injerto tumoral sólido	Inyección ectópica (subcutánea) Implantación quirúrgica (SOI) ortotópica en el colon, ciego o pared de recto

Tabla I. Modelos de implantación de CCR

La provocación de cáncer mediante inyección / implantación subcutánea es uno de los modelos más usado por ser técnicamente fácil de realizar. La accesibilidad de los tumores subcutáneos es una gran ventaja para monitorizar la progresión tumoral y para la valoración de los efectos de la intervención terapéutica [14].

Sin embargo, un gran inconveniente es que la microenvoltura subcutánea (ectópica) es muy diferente de la del colon e hígado. Estas interacciones entre la envoltura anfitriona y el tejido del tumor son las que determinan la expresión de la proliferación celular tumoral, los niveles de los factores de crecimiento y los nutrientes, tanto en la angiogénesis tumoral como en el comportamiento metastático lo que constituye una gran limitación de este modelo. Por ejemplo, el crecimiento de CCR en el colon provocó la aparición de metástasis, mientras que éstas no tuvieron lugar cuando el implante se colocó en el subcutáneo [18, 61-64]. También se ha comunicado que los tumores heterotópicos presentan diferente sensibilidad a los quimioterápicos [18].

El material implantado puede proceder directamente de un cáncer humano utilizando un fragmento de tejido [65, 66] o material procedente de cultivos celulares [16, 67] (tabla I).

Los modelos ortotópicos provocan el desarrollo de tumores en el colon, el ciego o pared rectal por inyección subserosa de células tumorales o por implantación ortotópica quirúrgica (SOI) de fragmentos de tumor. Estos fragmentos (habitualmente de 1 mm<sup>3</sup>) pueden obtenerse de cualquier biopsia o desde un crecimiento tumoral previo y se suturan en el ciego, en el colon o en la pared del recto. Para el éxito del implante se recomienda desperitonizar la zona de la pared intestinal donde se va a realizar la implantación [65-67].

Una gran desventaja de los modelos que utilizan tejido tumoral intacto es la naturaleza intrínsecamente heterogénea del material, según las diferentes zonas dentro de un mismo tumor. Esto hace difícil la estandarización y comparación de los resultados entre tumores procedentes de diferentes



sujetos. Por otro lado, el tejido tumoral humano a menudo contiene grandes áreas necróticas que no son adecuadas para experimentación [18].

## 2.- Biología del CCR

### 2.1.- Alteraciones en el material genético

Los avances en ingeniería genética han permitido el desarrollo de ratones con perfil genético alterado que les predispone al CCR. Así, los animales con una mutación en las células germinales del gen APC, el gen en ratón homólogo de APC humano [68], desarrollaron neoplasia intestinal múltiple (Min) a lo largo del tracto intestinal a una edad temprana. Se trata de un gen dominante y penetrante.

La mayoría de los tumores de ratones Min/+ se inician en etapas relativamente tempranas de la vida de modo que todos los adenomas parecen establecerse a los 100 días de edad o antes [69].

En estudios realizados con posterioridad, se descubrió un locu genético [70] que modifica fuertemente numerosos tumores en animales Min/+ [71]. Este gen, llamado Mom-1 (modificado de Min-1) se encuentra localizado en el cromosoma 4 y se ha podido caracterizar recientemente mediante la técnica de microarrays [72].

#### 2.1.1- Actuación modificando la vía mutadora

Mediante manipulación genética del gen APC en los codones 580, 716, 1309 y 1638 se han conseguido otros híbridos con características específicas.

Por ejemplo, la mutación en el codón 716 en el gen APC (APC delta 716) resulta letal en el ratón homocigótico y la mayoría mueren en el útero tras 8 días de gestación, pero los heterocigóticos desarrollaron múltiples pólipos a lo largo del tracto intestinal, sobre todo en el intestino delgado [8, 73].

La modificación del codón 1638 del gen APC genera un animal que progresivamente desarrolla tumores intestinales de una manera similar a lo

observado en pacientes con poliposis adenomatosa familiar y ratones Min/+ [74]. Los ratones heterocigóticos APC+/APC1638 desarrollaron progresivamente cinco o seis adenomas y adenocarcinomas en el intestino delgado durante los seis primeros meses de vida, siguiendo una secuencia histológica similar a lo observado en tumores intestinales humanos. Sin embargo, no se encontraron mutaciones en los genes K-ras, N-ras , H-ras y p53 [75]. Estos signos parecen indicar que, aunque la activación genética de APC está implicada en el inicio de la tumorigénesis, el crecimiento y progresión tumoral siguen diferentes caminos de mutación en el hombre y en el ratón [76].

Como se ha mencionado anteriormente, los ratones portadores de estas modificaciones del gen APC desarrollan múltiples adenomas a lo largo del tracto intestinal, especialmente en el intestino delgado [74], pero no desarrollaron tumor en el colon.

En cambio, las modificaciones en el axón 14 del gen APC en las células germinales [77] y la alteración de la N-terminal de la Beta-catenina (A33<sup>AN</sup> betacat) [78], inducen un fenotipo de ratones que desarrollan adenomas en el colon con un parecido perfecto que es equivalente a los adenomas de los humanos.

La inactivación del p53 inicialmente provoca formación de linfomas, aunque puede ser inducida por la administración de carcinógenos [79, 80]. Estudios de ratones con delección del p53, han revelado que, con la ausencia del p53, no tiene lugar la muerte celular por apoptosis, la cual ocurre por detención del ciclo celular en respuesta al daño del ADN.

Se ha demostrado que el mecanismo de acción de algunos quimioterápicos de uso frecuente (etoposide, adriamicina y 5-fluoracilo) es la inducción de apoptosis mediada por p53. Los tumores con p53 alterado fueron receptivos a estas terapias, en contraste con los tumores derivados de células sin p53 [81, 82].

Los modelos con modificación del APC han sido utilizados para estudiar aspectos de la carcinogénesis, la respuesta a agentes supresivos como la aspirina [83, 84] y el potencial carcinogénico de varias sustancias [85].

Los ratones con p53 inactivado son particularmente adecuados para estudiar la influencia de la dieta, carcinógenos y quimioterapia en progresión tumoral [13].

Los factores de crecimiento tipo TGF $\beta$  también participan en la formación tumoral a través de la activación del segundo mensajero Smad2, Smad3 y Smad4. Ratones con mutación Smad3 desarrollan metástasis de CCR, algunos de los cuales eran altamente agresivos y aproximadamente un tercio muy invasivos localmente [86].

#### 2.1.2- Actuación modificando la vía reparadora

También se han desarrollado ratones con alteración en los genes reparadores, pero su fenotipo no constituye un buen modelo para el cáncer de colon hereditario no polipoideo (HNPCC) [87].

Los ratones homocigóticos con delección en MLH-1 o MSH-2 desarrollan linfomas, pero son también propensos a neoplasia intestinal. Todos los ratones homocigóticos MSH2-deficientes sucumbieron a la enfermedad en el primer año de observación y presentaron linfomas en, al menos, el 80% de los casos.

Los ratones MLH1<sup>-/-</sup> desarrollan tumores gastrointestinales en un 33%; si además tienen el gen APC mutado, incrementan en 40 veces la probabilidad de presentar tumores gastrointestinales. Sin embargo, no se producen metástasis en estos ratones [87-90].

La exposición de animales con alteración en los genes reparadores a mutantes endógenos o exógenos pueden potenciar la génesis tumoral y condicionar el órgano donde se producirán los tumores [87, 88]. Tampoco inducen la apoptosis en respuesta a agentes alcalinizantes (la base alcalina

daña restos en el ADN y de este modo potencia la carcinogénesis). Esto puede tener implicaciones directas para la quimioterapia de pacientes con HNPCC [91].

### 2.1.3- Modelos para provocación de metástasis hepáticas

Se estima que el 10-25% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico de su CCR. El sitio preferido de formación de metástasis es el hígado. La presentación de metástasis hepáticas suele ser la causa de la muerte [62]. Por ello es esencial que en los modelos experimentales de CCR se desarrollen también metástasis (especialmente en hígado).

Los modelos de carcinogénesis químico, aunque proporcionan un buen modelo local de CCR, tienen una historia natural diferente comparando con la enfermedad en el humano [32]. La muerte es causada por progresión local del tumor y no por desarrollo de metástasis de hígado, fenómeno que tiene lugar muy raramente [42].

Se ha comunicado que sólo la implantación ortotópica de tejido tumoral es capaz reproducir metástasis [61, 63, 64] mientras que éstas no se producen en los modelos de implantación heterotópicos [16].

Sin embargo, un aspecto a menudo no tenido en cuenta, es que la presentación de metástasis puede ser un evento tardío y que en ocasiones no tiene lugar, sencillamente porque el animal ha muerto antes por el crecimiento local del tumor. Si el tumor primitivo es extirpado y el animal sobrevive, las metástasis pueden hacer su aparición poco tiempo después [8]. Por otro lado, la no aparición de las mismas no prueba el efecto contrario, ya que la resección podría haber sido curativa [16]. Esto puede explicar los resultados de otros autores que sí encuentran metástasis después de la implantación heterotópica de células tumorales [92].

La implantación quirúrgica ortotópica de células tumorales con alto potencial metastatizante en el colon de ratones desnudos da lugar a una rápida y eficiente formación de numerosas metástasis en el hígado (100%), ganglios linfáticos y bazo [61, 65, 93-96]. Este modelo es ideal tanto para estudiar muchos aspectos de la formación de metástasis, como para analizar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos.

También pueden inducirse metástasis hepáticas en el ratón por inyección intraesplénica o por inyección directa intraportal de células de CCR, aunque la eficiencia de formación de metástasis hepáticas es baja [97, 98].

Se inyectó una línea celular de adenocarcinoma colorrectal (LDLX40) inducida por 1,2-DHM a través de una de las ramas de la vena ileal mesentérica y se consiguió desarrollar metástasis tumorales hepáticas en ratas. Pasados 30 días, se detectaron macrometástasis hepáticas por cualquier método, tanto histológico o por ultrasonidos, desarrolladas en el 88% de las ratas y con micrometástasis en todos los animales [99]. No se detectaron tumores extrahepáticos. Este modelo ha sido usado satisfactoriamente en evaluación de tratamiento intraportal de interleukina y de interferón.

El potencial de metástasis de un determinado tumor o de una línea celular puede ser aumentado por pases sucesivos en animales. Este procedimiento consiste en aislar las metástasis hepáticas que posteriormente se expanden in vitro y subsecuentemente son re-inyectadas en el bazo o la vena porta. Con cada ciclo de selección, el potencial metastatizante de las células aumenta [100]. Pero hay que tener en cuenta que la población celular resulta seleccionada tras los diferentes pases en el cultivo y, por consiguiente, estos tumores podrían tener un comportamiento distinto que los originados a expensas de la línea celular primitiva.

Un inconveniente de los modelos de metástasis obtenidos por inyección directa de células tumorales dentro de la vena porta o por implantación directa de la metástasis en el parénquima hepático o esplénico es que no permiten el estudio del proceso de formación de metástasis en sus estadios iniciales [44].

Los estadios tempranos de la formación de metástasis, incluyendo la invasión local en el sitio del tumor primario y alcanzando accesos de conductos linfáticos o sanguíneos, requiere el crecimiento de un tumor ortotópico (por ejemplo en el colon) a partir del cual se generen metástasis espontáneas. Por ello estos modelos implicados se han utilizado para probar la eficacia de terapias experimentales en prevención de metástasis [65].

Las técnicas anteriores provocan metástasis diseminadas en el parénquima hepático. Sin embargo, para algunos tipos de experimentos, se puede requerir que los crecimientos tumorales se produzcan en un solo lóbulo hepático o, mejor aún, como un tumor solitario. Para obtener el crecimiento tumoral en un lóbulo hepático aislado, normalmente se usa una inyección subcapsular de suspensión de células tumorales. Puede obtenerse un único tumor hepático por implantación de fragmentos tumorales desde tumores preestablecidos (subcutáneo) [101].

### 3. Evaluación del crecimiento tumoral y de las metástasis

La evaluación de cualquier modelo de cáncer experimental obliga a cuantificar el tamaño y la progresión del mismo y por otra parte a caracterizar lo más posible el modelo producido con vistas a la ulterior extrapolación de los resultados en el humano.

Además del número de tumores y de la medida de los mismos antes o después de la fijación en formol, se ha intentado referir el tamaño del tumor al del segmento intestinal en el que asienta [102] o estimar el volumen tumoral (0.5 multiplicado por la longitud y por la anchura del implante) o valorar otros parámetros como el índice de crecimiento, que se calcula tras obtener el anterior resultado y dividirlo por las semanas de implantación [16].

Las técnicas más asequibles y por ello más utilizadas, incluyen comparaciones de parámetros histológicos y cromosómicos [103].

En un nivel más sofisticado se encuentran varias técnicas de biología molecular moderna, tales como análisis de la expresión genética y de expresión de proteínas

El tamaño de metástasis hepáticas se expresa habitualmente por la medición del área de tejido hepático que ha sido reemplazado por tejido tumoral. El análisis histológico del crecimiento tumoral tiene dos importantes inconvenientes: primero, el análisis sólo puede hacerse post mortem y segundo, consume mucho tiempo y es laborioso.

Recientemente Haier y cols [104] han puesto a punto una técnica que permite la observación en tiempo real, con un videomicroscopio de fluorescencia, de las células tumorales marcadas con Calcein AM (un cromóforo) en su trayecto a través de los sinusoides hepáticos. El inconveniente es que obliga a mantener inmovilizado el animal bajo el microscopio.



Es evidente que lo ideal es utilizar técnicas de imagen no invasivas que permitan monitorizar la iniciación del tumor, la progresión y la respuesta en un único animal por análisis de secuencia de imágenes.

Se han utilizado los métodos de imagen usados en la clínica [105, 106], incluyendo imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía computerizada (CT), tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía por emisión de fotón único (SPECT). Su uso no se ha generalizado porque se trata de métodos caros y poco accesibles.

Además de los métodos de imagen anteriores, para la monitorización del desarrollo y crecimiento de metástasis hepáticas de CCR en el animal de experimentación, se han utilizado la fluorescencia y la bioluminiscencia [107-109].

La detección del GFP (Green Fluorescent Protein) por métodos convencionales, tiene el inconveniente de que el alto nivel de expresión GFP que se requiere para permitir la captación de las imágenes por métodos no invasivos, pueden interferir con el crecimiento y la supervivencia de numerosas líneas celulares de tumor de CCR.

Otra limitación es la interposición de la pared abdominal, que absorbe y dispersa la señal. Esto puede ser obviado creando un colgajo de pared abdominal que puede ser abierta durante la toma de las imágenes y cerrada después, permitiendo múltiples medidas de crecimiento tumoral en un solo ratón. Alternativamente, el tejido tumoral marcado puede exponerse quirúrgicamente y de esta manera es posible visualizar la interacción del tejido tumoral local, la progresión tumoral, la angiogénesis y la formación de metástasis en el nivel celular único [99].

Aunque técnicamente es posible, consideraciones éticas hacen indeseable la realización y análisis de múltiples imágenes invasivas en un único ratón. Es probable que la aplicación a este método de la tecnología láser, mejore la detección de los límites y ratios de señal con ruidos y haga posible el

seguimiento del crecimiento de tumores fluorescentes sin técnicas invasivas de forma rutinaria básica.

Una alternativa al seguimiento del crecimiento tumoral por fluorescencia, es el uso de la bioluminiscencia. Para este fin, las células tumorales pueden ser modificadas para expresar luminosidad, mediante una fotoproteína (luciferasa) que emite luz cuando se genera por oxidación a expensas de la luciferina que se ha inyectado al animal previamente por inyección, habitualmente intraperitoneal. Cámaras de alta luminosidad foto-continuas pueden detectar secuencialmente la luz emitida desde las células tumorales.

Esta técnica es ideal para visualizar el crecimiento tumoral de una manera no invasiva y secuencial, y ha sido usada satisfactoriamente para el estudio del crecimiento de células de CCR en el hígado de ratón.

En conclusión, las imágenes ópticas (bioluminiscencia y fluorescencia) permiten monitorizar el crecimiento tumoral, la progresión y la formación de metástasis, así como la respuesta del tumor a la terapia. Cuando comparamos el clásico análisis histológico (dos dimensiones) con las técnicas de imagen mejoradas (tres dimensiones) descubrimos la precisión y la reproducibilidad, así como las enormes ventajas de medición seriada. Se requieren, por tanto, pocos animales para recoger resultados valorables [110].

#### **4. Elección del modelo en relación con el aspecto del CCR estudiado**

Se deduce de las descripciones anteriores que la opción del modelo varía dependiendo de la pregunta experimental.

##### **4.1- Historia natural**

Es recomendable utilizar uno de los modelos químicos de líneas celulares. Especialmente para estudios celulares y de biología molecular, se usan líneas celulares. Sin embargo, el modelo más riguroso es, probablemente, el modelo de ratón Min, ya que permite una cuidadosa correlación genética de la patogénesis del tumor.

##### **4.2- Quimioterapia**

El estudio, la eficacia y la seguridad de nuevos agentes antineoplásicos es un campo en el que el uso de modelos experimentales es imprescindible.

Habitualmente se han utilizado células de CCR humano que son implantadas en tejido subcutáneo, ortotópicamente, en ratones inmunodeprimidos.

Este modelo adolece de algunos inconvenientes. El cultivo de las células tumorales puede tener un efecto seleccionador de determinados clones con lo que el tumor implantado no refleja exactamente el tumor humano. En el caso de los implantados heterotópicamente la carencia de interacción con el estroma natural también induce cambios que pueden hacer variar los resultados. Esto hace que, en ocasiones, los resultados obtenidos en el laboratorio y en la clínica no sean coincidentes [111].

Sofisticadas técnicas de biología molecular permiten en la actualidad obtener modelos de ratones genéticamente modificados que desarrollan tumores que semejan más estrechamente el tumor humano [13].

Se han usado tradicionalmente un modelo químico, un modelo de línea celular o un modelo de resección. Sin embargo, el modelo de elección ahora, es el modelo de ratón Knockout (knk). Alternativamente, puede usarse la línea de CCR humano implantado en el ciego o dentro de la cápsula renal de ratones desnudos, particularmente en estudios de farmacocinética o de farmacodinamia [112, 113].

#### 4.3- Resección quirúrgica, escisión local, recurrencia

Se aconseja uno de los modelos de anastomosis o de resección quirúrgica. Son estudiados, sin embargo, comparando con resección quirúrgica en el contexto del modelo de ratón Knk. Todos los modelos deber ser tratados con precaución en los estudios de recurrencia local, porque, tal como se ha comentado en las descripciones anteriores, pueden presentarse nuevos tumores en todas las etapas de la vida del animal.

La mayoría de los estudios sobre recurrencia utilizan animales modificados genéticamente en los que el cáncer se induce por carcinógenos químicos. En estos modelos continúan presentándose nuevos tumores en todas las etapas de la vida del animal. Por lo tanto, un tumor que se presenta en el sitio de la anastomosis quirúrgica, puede representar tanto una lesión aparecida en ese momento, como una recurrencia local. Una posible excepción puede ser una variedad del ratón Min/+ en el cual, la vida expresada del ratón es de 300 días pero todos los adenomas y adenocarcinomas parecen haberse desarrollados a los 100 días [114]. Los últimos dos tercios de vida del animal pueden permitir una oportunidad de estudios de recurrencia local, de escisión local y de otras estrategias terapéuticas.

El estudio de la influencia de la dieta y del efecto de determinadas sustancias en la prevención del cáncer ha sido estudiado usando modelos de carcinogénesis inducida y APC<sup>Min/+</sup> [10, 31].

En la tabla II se enumeran algunas aplicaciones clínicas de los distintos modelos.

Modelo de ratón inducido químicamente	Influencias de la dieta en la carcinogénesis
Modelo de ratón transgénico convencional	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Función de productos genéticos y las consecuencias de sus expresiones en procesos normales</li> <li>- Función de genes en carcinogénesis (en combinación con otras condiciones predisponentes)</li> <li>- Estudio de la Influencia de carcinógenos y agentes quimiopreventivos en carcinogénesis colorrectal</li> <li>- Influencia de determinadas terapias en los procesos iniciales en cáncer (colorrectal)</li> </ul>
Modelos utilizando ratones transgénicos condicionales	<p>Análisis de drogas que interfieren con las vías mutadas de producción de cáncer</p> <p>Establecer la influencia de determinados genes o de combinación de genes en el desarrollo y la progresión del cáncer</p>
Modelos de implantación	
Ectópicos	Screening de gran cantidad de sustancias citotóxicas
Ortotópicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comprobar los efectos de terapias experimentales descritas en modelos de ratón ectópico</li> <li>- Analizar la patogénesis de las metástasis</li> <li>- Valorar el efecto de terapias en metástasis evaluando drogas que actúan sobre la interacción tumor-huésped</li> </ul>
Ratones singénicos	Evaluación de las terapias inmunes

Tabla II: Aplicaciones de los distintos modelos de ratón en el CCR

### **III. ESTADO ACTUAL DE LA BIOLOGÍA DEL CCR**

El CCR es la consecuencia de unas alteraciones genéticas en las células de la mucosa del colon, pero también de las interrelaciones que esas células establecen con el medio ambiente en el que asientan. Estos cambios en el ambiente que rodea a las células neoplásicas van a condicionar aspectos de crecimiento, invasión y metastatización del tumor por lo que también serán analizados en el presente capítulo.

## **1- Alteraciones en el material genético**

El concepto actual de carcinogénesis colorrectal implica una cascada de fallos genéticos que afectan a oncogenes, a genes supresores de tumores y a genes reparadores del DNA.

Los oncogenes son genes activados que proceden de un gen normal que se llama Protooncogen y fueron los primeros genes que se encontraron alterados en el CCR.

Estos genes codifican proteínas que están implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular. La aparición de mutaciones puntuales (K-ras, N-ras, H-ras), la amplificación génica (C-myc) o la translocación cromosómica (bcr/abl) desregulan la expresión génica y producen una proteína con su función alterada. Aparte del oncogén K-ras, que está implicado en el 40% de los CCRs, pocos oncogenes se han visto implicados en la carcinogénesis colorrectal.

La función de los genes supresores es la de inhibir la proliferación celular y promover la apoptosis. Cuando se pierde la expresión normal del gen se pierden, por tanto, estas funciones. Un importante número de genes de este tipo tienen un papel relevante en la carcinogénesis del colon: APC, DCC, p53 y MCC.

A diferencia de los oncogenes, actúan de manera dominante y la alteración de un único alelo es suficiente para producir la transformación celular, los genes supresores son de carácter recesivo. Por tanto, la pérdida de función de estos genes necesita de la inactivación de ambos alelos, la cual suele producirse por una mutación o por una delección (o por ambas). La comparación de los alelos presentes en el tejido tumoral con respecto a los del tejido normal permite la identificación de delecciones, siendo una de las más frecuentes la pérdida de heterocigosidad (LOH).



Las mutaciones que ocurren en los genes tumorales pueden venir inducidas por factores externos o por errores espontáneos que se producen durante la replicación del ADN.

Los genes reparadores del DNA (MMR) son genes que actúan detectando y corrigiendo los errores en la replicación del DNA, siendo imprescindibles para mantener la fidelidad de la replicación. Su carencia implica la acumulación de errores en el DNA aumentando la probabilidad de mutaciones, que cuando ocurren en los genes reguladores inician el proceso de carcinogénesis.

Se han identificado mutaciones asociadas al CCHNP en 5 de estos genes: hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6 y hPMS2, aunque los más frecuentes son los dos primeros.

Los tumores esporádicos que muestran pérdida aislada en el MLH1 suele ser debido no a mutación, sino a alteración de la metilación, un fenómeno cuya causa no es bien conocida y que se sabe aumenta con la edad [115].

Estos defectos en los genes MMR son identificados por la detección de la inestabilidad de los microsatélites (MSI). Los MSI son pequeñas porciones de DNA sin función conocida y que son fácilmente identificables en el tejido neoplásico cuando se compara con el tejido normal.

El Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda recomienda evaluar cinco locus para determinar el estatus de un CCR en la clínica respecto a la inestabilidad de MSI [116].

El CCR puede inducirse a través de 2 vías moleculares, la vía supresora y la vía mutadora, que fenotípicamente dan soporte a dos tipos de CCR diferentes, el polipoideo y el no polipoideo:

- La VÍA SUPRESORA se asocia a inestabilidad cromosómica y se manifiesta en el desarrollo de tumores con aneuploidía y pérdidas

frecuentes de heterocigosidad (LOH) en múltiples locus, así como mutaciones que activan oncogenes e inactivan o bloquean genes supresores. En el CCR, el oncogén Ras y los genes supresores APC y p53 son los prototipos. Pertenecen a este grupo el 80-85% de los CCRs de tipo esporádico (sin antecedentes familiares) polipoideos y los hereditarios de la poliposis adenomatosa familiar (PAF), que tienden a afectar más al colon distal.

- La VÍA MUTADORA se asocia a inestabilidad de MSI+. Se presenta en el 15% de los tumores esporádicos así como en el 85% de los CCHNP [116] que, en general, se caracterizan por estar localizados fundamentalmente en colon proximal y tener un mejor pronóstico con respecto a los cánceres de la vía supresora, aunque pueden tener peor respuesta a la quimioterapia [117]. Estos tumores son diploides y se observa una ausencia de mutaciones de los genes alterados habitualmente en los tumores de la vía supresora (Ras, APC y p53), siendo las mutaciones en MSI consecuencia de otras mutaciones en los genes reparadores del DNA.

En resumen, el desarrollo del CCR es un complicado proceso que involucra una combinación de factores genéticos y medioambientales.

No se ha demostrado aún cuántas vías son necesarias desde el punto de partida hasta la malignidad establecida o cuántos puentes de comunicación pueden existir.

Es probable que vayan surgiendo genes involucrados y la relación de estos con factores genéticos y medioambientales. El papel de genes supresores tumorales como p16, Ki-67, E-cadherina y  $\beta$ -catenina [118], y de proteínas involucradas en la apoptosis y el envejecimiento celular, como bcl-2 y telomerasa, también necesitan ser clarificados.

Es necesario profundizar en las razones de las diferencias en la epidemiología de los tumores colónicos y rectales, así como en el uso de

modelos como herramientas moleculares para redefinir el diagnóstico y el manejo de los pacientes [119].

La tecnología de los mycroarrays de DNA se ha convertido en una poderosa herramienta para la investigación de estas alteraciones [120] y permite diferenciar entre los distintos subgrupos dentro de un mismo tumor [121-124]

## **2.- Moléculas de Adhesión Celular (CAMs)**

Las CAMs, forman parte de un conjunto muy complejo cuyas funciones van más allá del simple reconocimiento y adherencia celular y que poseen enorme importancia en múltiples procesos biológicos, tanto normales como patológicos, que están en plena etapa de investigación [125-129].

Se ha descrito intervención de las CAMs en múltiples procesos biológicos de vital importancia tales como embriogénesis, reparación tisular, angiogénesis, envejecimiento y procesos de crecimiento, invasión y metastatización en neoplasias [125, 126, 130-132].

De acuerdo al número de cadenas pueden ser monoméricas, formadas por una sola cadena de glicoproteína, diméricas constituidas por dos cadenas idénticas y heterodiméricas, en las cuales ambas cadenas son diferentes.

En cuanto a las características generales las CAMs pueden ser "homofílicas" (aquellas que se unen específicamente a otras CAMs idénticas a ellas mismas) o "heterofílicas" (las que lo hacen con otros receptores o CAMs diferentes) [129, 133].

### **2.1- Familias de CAMs**

Estructuralmente existen cinco familias de CAMs:

2.1.1- Cadherinas

2.1.2- Superfamilia de las inmunoglobulinas

2.1.3- Integrinas

2.1.4- Selectinas

2.1.5- Proteínas de la matriz extracelular (Proteoglicanos)

### **2.1.1.-Cadherinas:**

Son moléculas monoméricas, que constituyen receptores homofílicos que se unen a cadherinas idénticas expresadas en células homo o heterotípicas para establecer contacto célula-célula. Su acción es calcio y temperatura dependiente. En una célula puede expresarse más de una cadherina [134]. Se conocen al menos doce de ellas pero las más estudiadas son tres:

2.1.1- E-Cadherina presente en epitelios de diferentes tejidos como hígado y riñón.

2.1.1.2- N-Cadherina propia del tejido neural, se expresa en el cerebro pero también en el músculo cardíaco.

2.1.1.3- P-Cadherina encontrada en la placenta.

Las cadherinas actúan permitiendo la adhesión celular, la persistencia de los espacios intercelulares, el desarrollo embrionario, el crecimiento embrionario, la implantación de los blastómeros y la morfogénesis [135-137].

Su acción predominante es el mantenimiento de la adhesión celular ente las células del epitelio intestinal, contribuyendo así a mantener la integridad del mismo mediante la asociación con un grupo de proteínas intracelulares (cateninas) [138, 139].

La pérdida de la expresión de E-cadherina se ha descrito en muchas neoplasias [140-142] y va asociada a tumores más avanzados, más diseminados y de peor pronóstico [143].

Recientemente [144] se ha descrito una variante de la E-cadherina (LI-cadherina: hígado intestino-cadherina). Estudios preliminares [145] parecen indicar que su pérdida de expresión se asocia a mayor desdiferenciación tumoral y peor supervivencia en el CCR.

### 2.1.2- Super familia inmunoglobulinas

Son receptores celulares que incluyen un gran número de proteínas, con diversas funciones y distribución tisular. Todas ellas comparten una región de 60 a 100 aminoácidos entre dos cisternas, que están dispuestos en dos bandas antiparalelas unidas por puentes disulfuro. Estas bandas forman un pliegue de Inmunoglobulina que constituye un dominio. Todos los miembros de esta familia poseen al menos uno de estos dominios. Algunas de estas CAMs son secretadas y dejan de ser receptores de superficie [129, 146-148].

Las CAMs de este grupo pueden ser monoméricas, diméricas o heterodiméricas. Respecto a las moléculas a las que se unen, pueden ser homofílicas o heterofílicas y pueden reaccionar con células homotípicas o heterotípicas.

- PCAM-1 ubicada en plaquetas y endotelio.
- ICAM1 y 2 (Inter cellular adhesion molecule).
- VCAM-1, (V por "vascular") se expresa en endotelios activados por factor de necrosis tumoral (TNF) en la inflamación vascular. Su ligación es una  $\beta$ -1 integrina, presente en leucocitos activados produciendo adhesión firme y migración leucocitaria.

Múltiples receptores presentes en los diferentes tipos de linfocitos, algunos con funciones inmunológicas conocidas y otros cuyos efectos aún no están bien comprendidos. En este grupo se ubican los receptores CD-1, CD-2, CD-3, CD-4, CD-7, CD-8, CD-19, CD-22, CD-28, CD-31, CD-54, CD-58 [128, 133, 149].

El epitelio colónico no expresa ICAM-1 en condiciones fisiológicas, pero sí bajo situaciones de inflamación crónica y en respuesta a estímulos con concentraciones suprafisiológicas de citokinas proinflamatorias [150] y en adenocarcinomas [151].

Valores de ICAM-1 están elevados en el suero de los pacientes con CCR [143]. Se cree que actuarían favoreciendo la adhesión entre las células tumorales y los linfocitos T facilitando así el acceso de estas al órgano diana.

También se ha demostrado que el aumento de la expresión del ICAM-1 aumentaría el número de células tumorales retenidas en los sinusoides, con lo que aumenta las metástasis hepáticas, fenómeno mediado por las IL 6, IL 10 y TNF- $\alpha$  [152].

### 2.1.3.-Integrinas

Son receptores de membrana heterodiméricos compuestos de una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$  que median interacciones célula-célula y célula-matriz. Se dividen en ocho familias, de las que las más conocidas son las tres primeras [153].

De estas ocho familias, desde las  $\beta$ -5 en adelante han sido descritas sólo recientemente y están en estudio. Se sabe que de las  $\beta$ -6, una de ellas, las  $\beta$ -6, 4  $\alpha$ , al parecer se encuentra sólo en las células epiteliales. Las  $\beta$ -7 se ubican en los linfocitos y en células epiteliales y cumplirían su función en el alojamiento de los linfocitos en las placas de Peyer y en la inmunidad a nivel de mucosas [133].

Estudios experimentales en CCR tanto in vivo como in Vitro, han demostrado que el aumento de las subunidades  $\alpha$ -6  $\beta$ -4 y  $\alpha$ -5  $\beta$ -3 de las integrinas suponen una mayor agresividad tumoral, probablemente porque protegen a la célula frente a la apoptosis [143].

Las integrinas median interacciones heterofílicas célula-célula y célula-matriz extracelular; se unen a proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina), a otras moléculas de adhesión (por ejemplo ICAM-1) o a moléculas solubles como el fibrinógeno y el Factor de von Willebrand. En definitiva, consolidan las interacciones iniciadas por otras moléculas de adhesión principalmente las selectinas [133]. Las interacciones con sus ligandos son dependientes de cationes divalentes: calcio para las 1-integrinas y magnesio para las  $\beta$ 2-integrinas [131, 154].

Las integrinas  $\alpha$  y  $\beta$  tiene un papel en la angiogénesis. Su bloqueo mediante un antagonista selectivo (el LH 609) [155] o por anticuerpos monoclonales antiintegrinas (Vitaxin) [156] produce apoptosis de las células endoteliales de los vasos neoformados y necrosis tumoral, incapacitando a las células endoteliales para la formación de nuevos vasos.



#### **2.1.4.-Selectinas o LEC-CAMs**

Son receptores de adhesión monoméricos cuya región extracelular aminoterminal contiene una porción semejante a lectina, un dominio parecido al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y varias estructuras semejantes a proteínas reguladores del Complemento. De ahí su nombre LEC-CAM, L por Lectina-símil, E por EGF-Símil y C por Complemento-símil (proteínas regulatorias) [157-159].

Se han descrito tres miembros en esta familia [160, 161]:

1. L-Selectina, denominada también LEC-CAM-1, MEL-14, LAM-1, Leu-8 ó LY-22, que se expresa constitutivamente en la mayoría de los leucocitos. Entre sus funciones está el alojamiento de los linfocitos en los ganglios periféricos. También interviene en la adhesión y acumulación de neutrófilos al endotelio inflamado.
2. E-Selectina o LEC-CAM-2 o ELAM-1, que se expresa de manera transitoria en los endotelios vasculares en respuesta a la IL1 o TNF en los procesos inflamatorios. Ella permite la adhesión de macrófagos y neutrófilos al endotelio inflamado.
3. P-Selectina o LEC-CAM-3, presente en las plaquetas y células endoteliales. Mediante esta CAM se adhieren los fagocitos a las plaquetas activadas y a las células endoteliales.

Las tres Selectinas tienen relación con la interacción célula-célula entre leucocitos y células endoteliales y células neoplásicas. Su rol más importante está en la adhesión inicial de neutrófilos y monocitos al endotelio activado por citoquinas, lo que permite posteriormente la quimiotaxis mediada por las Integrinas [133] y la migración transendotelial.

En los capilares del órgano a metastatizar, las células tumorales contactan con las células endoteliales gracias a las moléculas de adhesión tipo

E-Selectina (se encuentra más elevada en pacientes con metástasis de CCR que en pacientes sin metástasis) [162, 163].

Por otra parte, la P-Selectina favorecería la adhesión de las células neoplásicas con las plaquetas, lo que constituye una etapa clave para el establecimiento de metástasis. Se cree que el efecto parcialmente antimetastático de las heparinas es debido justamente al bloqueo de la P-Selectina [164].

### **2.1.5.- Proteoglicanos**

Esta familia de proteínas tiene en común la presencia de una o más cadenas laterales glucosa-amino-glicano mediante las cuales interactúan con las proteínas de la matriz y con factores de crecimiento. Los proteoglicanos forman parte de la matriz colágena, pero también existen algunos que se expresan en superficies celulares y permiten que ellas se unan a la matriz [129].

### **3.- Antígeno Carcinoembrionario (CEA)**

El CEA es una glicoproteína de 200 K Da. producida por las células del epitelio glandular secretor del feto. Fue la primera de las llamadas proteínas carcinoembrionarias descubiertas; se encontró en suero de enfermos de CCR en 1956, y se creyó específico del mismo. El CEA recibe su nombre porque es posible encontrarla en el endodermo primitivo y está ausente en la mucosa normal del adulto [165].

El patrón inmunohistoquímico del CEA se mantiene en el tumor implantado con las mismas características que en el tumor original [166].

Se ha demostrado que el CEA interviene en la interacción célula-célula, el reconocimiento bacterial y potencia la metastatización hepática [167].

La adición de CEA a células Kupffer en cultivo provoca un aumento en la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF con el consiguiente aumento de la adhesión endotelial de las células neoplásicas. Este fenómeno se ve bloqueado con la adición de inhibidores de las citoquinas [168].

También se interrelaciona con antígenos sanguíneos del tipo Lewis e inhibe la relación de las células tumorales circulantes con las células Nk, con lo que se produce una menor lisis tumoral [169].

Sus mediciones en clínica se realizan por radioinmunoanálisis y los valores pueden variar según la técnica empleada. Posteriormente, utilizando anticuerpos más específicos, monoclonales, y técnicas más sensibles, se vio que se halla también en otros tumores: malignos (gastrointestinal, pulmonar, tiroides, genitourinario, mama, próstata, páncreas, cuello de útero, vejiga, ovario e hígado) y procesos benignos (enfermedad intestinal inflamatoria, pólipos, cirrosis, pancreatitis y neumonía) e incluso en personas sanas (fumadores) [165, 170-172].

El CEA puede considerarse un marcador tumoral de amplio espectro, siendo empleado en la mayoría de las neoplasias epiteliales, digestivas (colon, recto, estómago, páncreas), mamarias, pulmonares, tumores de cabeza, cuello y ginecológicas (endometrio, cérvix) entre otras [169].

Las principales aplicaciones clínicas son en el pronóstico, el diagnóstico precoz de recidiva (sensibilidad del 80%) y la monitorización terapéutica. En los demás tumores donde se emplea el CEA, suele tener las mismas aplicaciones, si bien con una menor sensibilidad.

En conclusión, el CEA preoperatorio (>5 ng/ml) y la localización (recto) son factores pronósticos independientes en la supervivencia del CCR, lo que concuerda con otros autores [173, 174]. Aunque este marcador no tiene una correlación lineal con el estadio, un nivel de CEA preoperatorio elevado debiera ser considerado, junto al estadio, en la selección de los pacientes de alto riesgo de recidiva, susceptibles de recibir una terapia adyuvante. Un CEA preoperatorio elevado es indicativo de una enfermedad localmente avanzada y se asocia con un mayor riesgo de recidiva. Un CEA preoperatorio muy elevado sugiere enfermedad diseminada, lo que es particularmente destacado en el cáncer del recto. Numerosos resultados apoyan la utilización del CEA preoperatorio como un factor complementario del estadio en la toma de decisiones en el preoperatorio, puede orientar la estrategia terapéutica y eventualmente sugerir la frecuencia e intensidad del seguimiento oncológico.

#### **4. Citocinas (TNF y otras)**

Las citoquinas son un grupo de polipéptidos producidos por varios tipos celulares especialmente monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales, que juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria.

La asociación entre cáncer e inflamación en un órgano o tejido se encuentra sólidamente establecida. En efecto, se sabe que en sitios de inflamación crónica, existe una mayor probabilidad de que se origine un tumor y que procesos inflamatorios locales pueden acelerar el crecimiento de tumores preexistentes en animales y seres humanos [175].

Más aún, muchos tumores generan por sí mismos un ambiente pro-inflamatorio compuesto de citoquinas, factores de crecimiento, estroma activado, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y agentes que inducen daño en el DNA, lo cual podría ampliar un proceso inflamatorio preexistente que a su vez generaría un mayor crecimiento y malignidad del tumor [176, 177]. La inoculación de células de fibrosarcoma en el ratón provoca un aumento transitorio de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF) que se normaliza a la semana y que va seguido de un progresivo aumento de las mismas en relación con el tamaño del tumor [175].

Pero en algunos cánceres justamente se detecta una proporción variable de infiltración linfocitaria (linfocitos T) peritumoral y ello parece estar relacionado con un mejor pronóstico [152].

Así, determinadas citoquinas IL-1, IL-6 y TNF liberadas durante el acto operatorio pueden actuar favoreciendo el crecimiento y diseminación tumoral, favoreciendo la producción de I-CAM y V-CAM a nivel del endotelio pulmonar y favoreciendo la producción de metástasis pulmonares [178].

A nivel hepático, las células de Kupffer, bajo el estímulo del CEA, pueden producir determinadas citoquinas que, vía expresión de I-CAM, pueden

contribuir a aumentar la retención de células neoplásicas en los sinusoides, favoreciendo así la producción de metástasis [179].

Otros autores [180], han demostrado que la autovacunación con TNF genera niveles elevados de anticuerpos anti-TNF que son capaces de bloquear la producción de metástasis, reduciendo de modo significativo el número y el tamaño de las mismas en un modelo experimental de melanoma en ratones B16F10.

Por otra parte existen numerosas experiencias que demuestran que determinadas citoquinas (IL-2 e IL-12) tiene un efecto inhibitor del crecimiento tumoral y de las metástasis [181-183].

De esta manera Kusnierczyk [184], demostró que la administración local de IL-2 a un tumor de colon transplantado indujo una respuesta macrofágica local con necrosis tumoral. Miller et al [185], administrando vía intraportal IL-12 asociada a vector retroviral en ratones con metástasis hepática de CCR experimental, consiguieron una significativa reducción de la masa tumoral junto con la infiltración del tejido neoplásico de células T, CD8+ y NKT.

Otros estudios [186], muestran cómo tumores cólicos murinos provocados por implantes intradérmicos, son erradicados mediante la administración intralesional de células dendríticas productoras de IL-12.

Kuniyasu [187], ha puesto de manifiesto que la capacidad invasiva de los CCR impactados en polo cecal de ratones desnudos está mediada en parte por la producción de IL-15.

Más recientemente Coca [188], consigue demostrar que la administración de IL12 intraperitoneal en ratas, previa a la inducción experimental de un CCR, muestra una menor tasa de inducción tumoral y menor tamaño tumoral en relación con la mayor densidad de células NK en el infiltrado.

Todos estos hallazgos ponen de manifiesto que determinadas citoquinas pueden actuar modulando el crecimiento tumoral actuando sobre la angiogénesis, sobre la activación de la respuesta inmune y/o sobre la proliferación celular [183].

El equilibrio entre estos dos roles contrapuestos de las citoquinas en la inflamación, puede inclinarse a veces hacia el lado del rechazo tumoral, como ocurre en ratones inmunizados contra ciertos tumores inducidos por carcinógenos químicos o virales. En otras situaciones, sin embargo, puede inclinarse hacia el lado de la exacerbación tumoral [175].



## 5. Radicales Libres (RLO)

RLO es un término que incluye muchos compuestos, tales como radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ), radical peroxilo ( $RO_2^-$ ) y radical alcoxilo ( $RO^-$ ), pero también ciertas especies que no son radicales pero también actúan como agentes oxidantes o son fácilmente convertidos a radicales, tales como ozono ( $O_3$ ), peroxinitritios ( $ONOO^-$ ), agua oxigenada ( $H_2O_2$ ).

El término reactiva tampoco está bien empleado, ya que entre estos compuestos algunos son extremadamente reactivos con casi todas las sustancias ( $OH^-$ ), mientras que otros, tales como el  $H_2O_2$  y el  $O_2^-$ , reaccionan sólo con determinadas moléculas [189].

En cualquier caso todas estas moléculas comparten ciertas propiedades biológicas tales como

- Modular la actividad de determinadas proteínas y genes que responden al estrés.
- Modular la actividad de los genes implicados en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis [190].
- Producción de las alteraciones estructurales en el DNA que conducen a alteraciones cromosómicas implicadas en la carcinogénesis y progresión tumoral [191].

Se trata de compuestos que son producidos constantemente en las células animales y humanas y actúan como mediadores esenciales de la fagocitosis antimicrobiana, de reacciones de detoxificación y de la apoptosis. Cantidades excesivas de RLO pueden inducir daño oxidativo en los componentes y macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y DNA, lo que puede desencadenar la apoptosis y promover una serie de enfermedades [192].

Se ha observado que los RLO parecen tener un rol importante en un tipo especial de apoptosis llamado anoikis, ya que al desprenderse una célula endotelial se registra un rápido ascenso en los niveles de RLO, probablemente provenientes de la mitocondria. Se ha observado una correlación entre los niveles de Radicales Libres y la cantidad de muertes celulares [193]; por lo tanto, el estrés oxidativo puede activar la apoptosis.

Se conoce que los antioxidantes inhiben directamente la apoptosis en muchas líneas celulares [194]. La presencia de antioxidantes en el medio inhibe la actividad de JNK (Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase) y de la caspasa 3 inhibiendo la apoptosis y presentándose una correlación positiva entre los niveles de RLO y la actividad de la caspasa [193].

Por otra parte, se ha comprobado que el consumo de antioxidantes exógenos (vitaminas E, C,  $\beta$ -carotenos y otros) podrían disminuir la apoptosis inducida por el estrés oxidativo [195]. Entre los mecanismos observados se han visto descensos en las moléculas anti-apoptóticas survivina y Bcl-xL, activación de caspasas 8 y 3 y ligeros aumentos de la pro-apoptótica Bax, entre otros [196].

Por tanto, hay evidencias de que los antioxidantes, como las vitaminas A y E, pueden proteger a las células contra el daño oxidativo al DNA y prevenir la acumulación de defectos genéticos que llevan al desarrollo de cánceres. Sin embargo, muchas células neoplásicas son sensibles a la apoptosis desatada por los RLO, por lo tanto, los antioxidantes pueden inhibir esta apoptosis y acelerar así el desarrollo de tumores ya establecidos [197]. Estos efectos potencialmente opuestos pueden explicar los resultados mixtos obtenidos en estudios que evalúan los efectos de la suplementación de vitaminas sobre las tasas de cáncer [198, 199].

## 6.- Patogénesis del crecimiento tumoral

En las células normales, el crecimiento y la replicación es un fenómeno estrictamente regulado y la alteración de estos mecanismos reguladores provoca un crecimiento desordenado que constituye el substrato del crecimiento tumoral. Hanahan [200] ha sintetizado alteraciones en los mecanismo reguladores que están presentes en la carcinogénesis:

1.- Alteración en las señales reguladores del crecimiento y en los estímulos frenadores de la replicación. Las células normales necesitan recibir estímulos para activar tanto su proliferación como la inhibición de la misma. Las células neoplásicas son capaces de proliferar sin necesidad de recibir estas señales y no responden a los estímulos frenadores de la misma.

2.- Apoptosis. La apoptosis (muerte celular programada) es probablemente el mejor mecanismo que tiene el organismo para destruir las células que presentan alteraciones significativas. Las células neoplásicas evitan la apoptosis para continuar su desarrollo y proliferación incontrolada.

3.- Limitación del potencial replicativo. Las células normales son capaces de replicarse un número limitado de veces. Las células neoplásicas tienen un potencial ilimitado de replicación.

4.- Angiogénesis. Todas las células deben situarse en un radio de 100nm de los capilares para conseguir adecuados niveles de nutrición. La angiogénesis es un fenómeno estrictamente regulado y el balance entre inductores e inhibidores de la angiogénesis tisular constituye un mecanismo esencial de la homeostasis. Las células neoplásicas son capaces de estimular la angiogénesis evadiendo los mecanismos de control para continuar con su crecimiento y proliferación desordenados.

5.- Desarrollo de la capacidad de invadir y metastatizar. Para el desarrollo del cáncer es imprescindible que las células neoplásicas desarrollen mecanismos que sean capaces de sustituir a los tejidos circundantes y tener capacidad de implantarse a distancia (metástasis). El cáncer es capaz de inducir cambios importantes en el microambiente que rodea a las células, que les permite que pierdan la adherencia normal entre ellas.

Como consecuencia de estas alteraciones en el material genético, la célula neoplásica sufre profundas transformaciones que se manifiestan, por ejemplo, en la expresión de distintas CAMs, que modifican la relación de las células entre sí (cadherinas, Immunoglobulinas) o su relación con la matriz extracelular (integrinas) y el endotelio (integrinas, selectinas). Fenómenos como la capacidad de crecimiento sin control, la invasibilidad local, la angiogénesis y la producción de metástasis a distancia están también relacionados con estas moléculas.

Además, las células tumorales adquieren motilidad y capacidad invasiva al reducir la producción de ciertas proteínas de la matriz extracelular (la fibronectina) o al perder la E-cadherina [201].

Otro tipo de moléculas son expresadas por las células tumorales y ejercen su acción a distancia y, por ello, son susceptibles de ser detectada en los líquidos biológicos y sirven como marcador de actividad. El CEA interviene en la interacción célula-célula y potencia la metastatización hepática, quizá modulando la secreción de ciertas citoquinas (IL1b, TNF, IL-6) que estimulan la formación de CAMs (ICAM-1) y la consiguiente retención de células tumorales en los sinusoides aumentando la tasa de metástasis [152, 179]

## **7.- Mecanismo de proliferación e invasión local**

El proceso por el que el tejido tumoral proliferante invade los tejidos normales depende de varios factores.

En primer lugar, a la simple presión mecánica producida por el sobrecrecimiento de las células tumorales. A medida que prolifera el tumor va siguiendo líneas de menor resistencia [202-206]. Así va penetrando en las capas de la pared intestinal y se difunde a través de los espacios perineurales [207]. Esta invasión se ve también favorecida por el aumento de la motilidad de las células tumorales.

Además, las células tumorales pueden secretar enzimas capaces de degradar las membranas basales rompiéndose así las barreras entre las células epiteliales y el estroma.

Para que las células tumorales puedan invadir tejidos adyacentes, deben ser capaces de desprenderse del tumor primario, venciendo unas fuerzas de adhesión que tienden a mantenerlas unidas, gracias a unas moléculas de adhesión: cateninas y E-cadherina. Enfermos con CCR en estadios avanzados presentan concentraciones bajas de  $\alpha$ -catenina y E-cadherina [208, 209]. Por tanto, algunos autores asocian esta reducción con tumores más indiferenciados y de peor pronóstico [210, 211].

Los cambios en la expresión de las cadherinas juegan un papel fundamental en la progresión del tumor. Así, por ejemplo, la inhibición de la Cadherina E por Anticuerpos que bloquean su función, inducen un cambio en el fenotipo tumoral de epitelioide a invasivo [134]. Pero es que, por otro lado, la pérdida de la E-cadherina, además de reducir la adhesividad intercelular, podría proporcionar un estímulo oncogénico por la liberación de la B-catenina de la membrana que actuarían activando genes del tipo de c-myc, ciclina D1, fibronectina y matrilisina que son esenciales en la proliferación celular [212].

Las integrinas constituyen otro grupo de receptores de superficie. Algunos miembros de esta familia específicamente unen las células a láminas de colágeno o fibronectina [213, 214]. Muchas integrinas se expresan en la superficie de las células del CCR humano y actúan manteniendo la unión de los distintos componentes tisulares. Una disminución en la expresión de estas sustancias se ha asociado con un mayor grado de invasión tumoral sugiriendo que los cánceres más agresivos tienen menos expresión de integrinas [215].

Como ya se citó anteriormente, todas las células, incluidas las tumorales, cuando pierden contacto entre sí o penetran en la matriz extracelular sufren un tipo de apoptosis denominada anoikis. Las células tumorales son capaces de desarrollar resistencia frente a esta muerte celular, elaborando un tipo de moléculas de adhesión como son las integrinas [216]. Estudios experimentales de CCR, tanto in vitro como in vivo, demuestran un aumento de las subunidades  $\alpha$ -6  $\beta$ -4 y  $\alpha$ -5  $\beta$ -3 de las integrinas y la relacionan con mayor agresividad del CCR [217, 218].

Otro grupo de proteínas que actúan uniendo la matriz extracelular a los distintos componentes son las lecitinas, que unen los liposacáridos con alta especificidad. Las células intestinales normales contienen dos tipos de lecitinas de 31.0 y 14.5 kDa [219, 220].

La expresión de la lecitina de 31 kD estaría aumentada en carcinomas, siendo muy débil en la mucosa normal y en adenomas. Su contenido en cánceres está en relación con los niveles de CEA [221].

El CD44 también está aumentado en CCR humanos respecto a la mucosa de colon normal [222, 223] y actúa regulando la migración a través de la matriz extracelular.

Las células tumorales también pueden actuar degradando los componentes del conectivo [224] produciendo proteasas y glicosidasas capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular. Se ha demostrado que la capacidad de producción de colagenasa tipo IV y

heparinasa está en relación con la capacidad invasiva de un determinado tumor [225, 226].

En condiciones experimentales la actividad colagenásica de un tumor puede ser estimulada con productos de mucina purificada, lo que le hace más agresivo [227].

Las células tumorales humanas también secretan un activador del plasminógeno, la uroquinasa, que activa el complejo plasminógeno-plasmina que actúa degradando la membrana basal a través de la activación de la colagenasa tipo IV.

El CEA es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas que participa en fenómenos de reconocimiento y unión intercelular [228], tanto de células tumorales entre sí, como con las células normales [229].

## 8.- Angiogénesis

La aparición de neovascularización o angiogénesis tiene lugar cuando la masa tumoral proliferante es mayor de 2 mm de diámetro [230].

La angiogénesis tumoral, conlleva un complejo proceso secuencial, en el que la activación de las células endoteliales procede de factores angiogénicos elaborados por el propio tumor (autocrino) [231, 232], pero también por células del estroma tumoral, mastocitos, fibroblastos, macrófagos, etc., reclutados por las células tumorales, así como de factores angiogénicos secuestrados en la matriz extracelular [230, 233].

La activación de la angiogénesis viene mediada por la hipoxia tumoral [234], por la aparición de oncogenes y la pérdida de genes supresores. En modelos experimentales, ciertos oncogenes (v-ha ras, v-raf, k-ras) estimulan la angiogénesis induciendo la formación de VEGF [235, 236] y reduciendo la trombospondina 1, que es un potente inhibidor de la angiogénesis [237, 238]; la pérdida del p53 produce una disminución de la trombospondina 1 y un aumento del VEGF [239].

La angipoyetina 1 [240], la angiogenina y la E-Selectina facilitarían la migración de las células endoteliales.

Las integrinas  $\alpha$  y  $\beta 3$  tienen un papel preponderante en la angiogénesis, ya que sin su presencia mediante la administración de un antagonista, LH609, se produce apoptosis de las células endoteliales de los vasos neoformados, bloqueando el crecimiento tumoral e induciendo la regresión tumoral [155, 241].

Además, existen otras moléculas que, de forma inespecífica, se encuentran implicadas en la angiogénesis. Las metaloproteinasas, fundamentalmente la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B), actuarían degradando la matriz extracelular [242].



Entre los inhibidores de la angiogénesis destaca la trombospondina 1, que interfiere la adhesividad, motilidad y actividad proteolítica de las células endoteliales [243]. La angiostatina es una fracción del plasminógeno que impide la degradación de la matriz extracelular [243] y la endostatina [244].

## 9.- Metástasis

Se entiende por metástasis la transferencia de células tumorales desde un órgano a otro no directamente relacionado por contigüidad y constituye la causa de muerte de los pacientes con cáncer.

El proceso se inicia con la disrupción de la unión entre las células y la membrana basal, lo que supone una alteración de las moléculas de adhesión invadiendo el tejido vecino y penetrando en el torrente circulatorio (sangre o linfático).

El proceso continúa con el transporte por el torrente circulatorio, para lo que es precisa la supervivencia de las células en él, la detención de las mismas en los capilares, su extravasación en los tejidos y la anidación y crecimiento en el tejido afecto [134], con la participación de las integrinas [245].

### 9.1- Metástasis linfáticas

Debido a que las delgadas paredes de las vénulas y de los linfáticos ofrecen poca resistencia al paso de las células neoplásicas, eso constituye una vía fácil de penetración en la circulación [246].

Las células son transportadas pasivamente en la linfa y atrapadas en el primer ganglio linfático o pueden saltar los primeros linfáticos y producir metástasis a distancia (metástasis a saltos) [247-249]. Se ha estudiado el papel de los ganglios linfáticos regionales como barrera a la diseminación de las células tumorales sin resultados concluyentes. La cuestión tiene evidente significado clínico cuando consideramos los límites de la linfadenectomía quirúrgica en el tratamiento del cáncer [250].

### 9.2- Metástasis vía hematológica

Una vez en el torrente circulatorio, las células tumorales deben hacer frente al sistema inmunitario para poder acceder al órgano diana. Posiblemente

uno de los medios empleados sería la unión a los linfocitos T, la cual se realizaría gracias a una serie de glucoproteínas, como la ICAM-1 [251, 252]. Por su parte, el CEA actuaría como una molécula de adhesión, facilitando la unión de las células tumorales entre sí y entre las células del huésped [179].

El lugar más frecuente de localización de las metástasis vía hematogena es el hígado, seguido del pulmón. En el 40% de las autopsias es el hígado el único lugar afecto mientras que la existencia de metástasis en otra localización con el hígado intacto es raro [253].

Una vez que las células neoplásicas se hallan en el torrente circulatorio deben sobrevivir, ser transportadas y adherirse a los pequeños vasos o capilares e invadir los tejidos vecinos. La mera presencia de células neoplásicas en el torrente circulatorio no se considera metástasis ya que muchas células mueren en el torrente sanguíneo [248, 249, 254]. Por ello, cuanto mayor sea el número de células presentes en el torrente circulatorio mayor será la probabilidad de que se establezcan las metástasis.

La producción de necrosis y hemorragia en un tumor facilita que las células neoplásicas entren en la circulación [249].

La rápida muerte de muchas células tumorales cuando penetran en la circulación probablemente es debida a simples factores mecánicos, tales como turbulencias del flujo o a los mecanismos de defensa del huésped, inmunológicos o no (actividad del endotelio y producción de óxido nítrico por ejemplo) [254].

La probabilidad de supervivencia de las células neoplásicas en el torrente sanguíneo aumenta si se agregan unas con otras [254-256] con plaquetas [257] o a linfocitos [258].

Cuando las células neoplásicas han alcanzado el torrente sanguíneo interactúan con las células del endotelio.

Entre ellas destaca la E-Selectina, encontrándose más elevada en pacientes con CCR con metástasis hepáticas que en pacientes sin metástasis [163, 259]. Del mismo modo, destacan unos oligosacáridos de cadena larga, sialyl-LewisX, presentes en los leucocitos y también en células tumorales, los cuales se encuentran elevados en enfermos con CCR y metástasis hepáticas [260, 261].

Por último, consideraremos otra glucoproteína, CD44, presente en linfocitos y algunos tejidos y que también participa en la unión intercelular y de las células con la matriz extracelular. Las variantes CD44 v6 y v8-10 han sido relacionadas con metástasis y recurrencia de la enfermedad [262, 263]. En cambio, los valores plasmáticos de CD44 no se han podido relacionar con el estadio de la enfermedad [264].

Las células tumorales probablemente se extravasan por los mismos mecanismos que por los que tiene lugar la invasión local. El crecimiento ulterior de las células en el nuevo tejido depende de la interacción de las mismas con el tejido local a través de factores órgano-específicos [254, 255, 265].

### 9.3- Metástasis por extensión directa

La diseminación intraluminal ocurre por la suelta de células viables procedente de la superficie tumoral y su implantación distal, habitualmente en sitios de inflamación crónica, tales como úlceras, fístulas o hemorroides [266-268], cicatriz de laparotomía [269], margen de la colostomía.

También puede tener lugar la implantación peritoneal por un mecanismo similar en ausencia de invasión hematógica linfática.

Otras formas de diseminación están en relación con la manipulación quirúrgica. La incidencia en la línea de sutura es aproximadamente del 10%, lo que puede ser debido a diseminación tumoral o a incompleta escisión quirúrgica [206].

#### **IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **1.- Hipótesis**

El modelo tumoral obtenido por implantación de material neoplásico procedente de humanos en un animal inmunodeprimido, debe provocar la aparición de un tumor que replique fielmente el perfil del humano.

Las CAMs, los marcadores tumorales y los RLO median muchos de estos fenómenos y por ello, la caracterización de un modelo en base a la expresión de estos parámetros, puede ser un método fácil y fiable para definir el comportamiento de un determinado tumor.

## **2.- Objetivos**

### 2.1-Objetivos generales

Revisión del estado actual de los modelos experimentales del CCR, con particular énfasis en los modelos inducidos en animal de experimentación por implante de material integro procedente de humanos.

Estandarización de todos los pasos de la técnica de modo que se consiga obtener un modelo estable y reproducible, susceptible de ser empleado en ulteriores estudios.

### 2.2- Objetivo específico

Caracterización del modelo mediante el estudio de los niveles de expresión de CAMs, marcadores tumorales y RLO y su comparación con los mismos parámetros analizados en el material humano de procedencia.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1.- Generalidades**

Previamente al inicio de la parte experimental del presente trabajo y al margen de la búsqueda bibliográfica habitual encaminada a recabar información sobre el procedimiento que queríamos llevar a cabo, realizamos una búsqueda bibliográfica exhaustiva de todas las publicaciones aparecidas en los tres últimos años en las revistas más importantes de MEDLINE (core-journals) para evaluar la importancia de los distintos modelos experimentales utilizados en este campo.

En todo momento el manejo y los métodos experimentales empleados con animales de laboratorio que se detallan a continuación, se han regido siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- a) Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE, relativa a la protección de los animales de laboratorio utilizados para la experimentación y otros

finés científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N° L 358/1-358/6 del 18 de diciembre de 1986.

- b) Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE n° 67, pp 8509-8512 del 18 de marzo de 1988.
- c) Disposición general n° 25805. Instrumento de ratificación del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de marzo de 1986. BOE 256 pp 31349-31362, del 25 de octubre de 1990. Esta ratificación entró en vigor en España el 1 de enero de 1991.

### **1.1.- Lugar de realización**

Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, que cumple la legislación vigente para la cría, mantenimiento y control de los animales de experimentación.

Laboratorios de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, dotados de toda la infraestructura necesaria para la realización del modelo experimental.

Laboratorios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, donde se realizaron los estudios anatomo-patológicos.

## 1.2.- Animal de experimentación

Ratones desnudos hembras de la cepa CB-17/lcr Han Hsd-scid, suministrados por el Servicio de Experimentación Animal (SEA), estabulados en condiciones adecuadas, mantenidos en jaulas esterilizadas y alimentados con una dieta de pienso y agua esterilizada (Foto 1).



Foto 1. Jaulas esterilizadas para el mantenimiento de los ratones

## **2.- Plan general**

### **2.1.- Cuidado y manipulación de los animales**

Los animales fueron estabulados en el Animalario Central de la Universidad de Salamanca hasta la realización de las pruebas.

El animalario cumple todos los requisitos para el manejo de estos animales.

El mantenimiento, traslado de los animales, técnica quirúrgica y mantenimiento postoperatorio se ha realizado en todo momento sin romper la cadena de esterilización.

## 2.2.- Estudios preliminares

Previo a la estandarización de la técnica como se describe, se han realizado estudios preliminares de todos los pasos de la misma encaminados a seleccionar el tipo más idóneo de anestesia, a entrenamiento del equipo a trabajar bajo la campana de flujo laminar, a la manipulación de animales y jaulas en ambiente estéril, morbi-mortalidad del grupo simulado, estimación del tamaño de la muestra tumoral, estimación del mejor modo de realizar el implante etc. (Foto 2)



Foto 2. Campana de flujo laminar

### 2.3.- Procedimiento para la realización de implantes tumorales

Se realizó en el laboratorio de cirugía experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, dotado de quirófano estéril con debido aislamiento del resto del laboratorio con doble puerta.

El cirujano observa las mismas condiciones de asepsia que en el quirófano humano: pijama, gorro y calzas, lavado de manos y bata y guantes estériles (Foto 3).

EL procedimiento quirúrgico es llevado a cabo bajo campana de flujo laminar (Foto 4)



Foto 3. Mantenimiento de la esterilidad durante el proceso

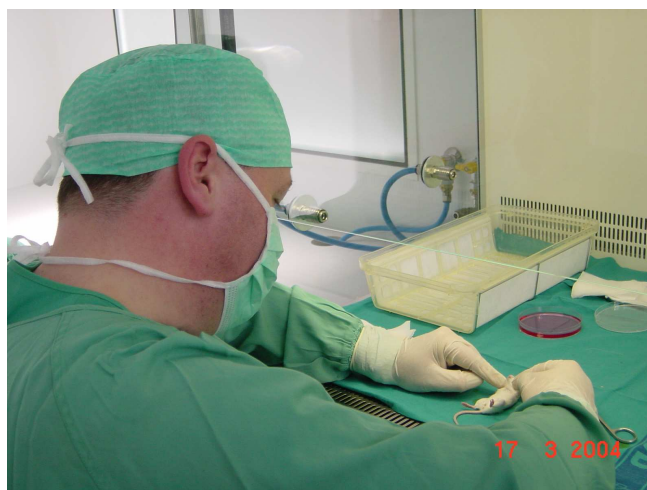


Foto 4. Procedimiento quirúrgico bajo campana de flujo laminar

### **2.3.1.- Anestesia**

Se realizó una inducción anestésica con Atropina (20 mg/kg) + Diazepam (Valium®) (50mg/kg) + Ketamina (Ketolar®) (75mg/kg), aplicándose mediante inyección intraperitoneal con aguja de insulina.



### 2.3.2.- Procedimiento quirúrgico

Una vez anestesiado el animal, se procedió a la preparación del campo quirúrgico mediante la aplicación de una solución de povidona yodada (Betadine®, Asta Médica) y a su colocación y fijación sobre paños estériles.

Al animal se le realizó una laparotomía xifo-pubiana, se localiza el ciego y se expone al exterior. Un fragmento de tejido tumoral, humano en los primeros implantes y de ratón en los segundos implantes, de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$ , se implanta en el ciego, donde previamente se ha producido una efracción del peritoneo visceral, con precaución de no realizar una perforación intestinal. El fragmento se mantiene in situ fijándolo con dos puntos de seda de 5/0. Durante el procedimiento se evita la desecación intestinal instilando suero fisiológico. Posteriormente se reintroduce el polo cecal y se procede al cierre de la laparotomía mediante sutura continua con seda de 4/0 (Foto 5).



Foto 5. Fijación del tumor en el ciego del animal

#### **2.4.- Seguimiento y controles postoperatorios**

Una vez revertida la anestesia, los animales son colocados de nuevo en jaulas y mantenidos en ambiente estéril donde se les ofrece agua y comida estandar.

En estas condiciones son vigilados periódicamente y mantenidos hasta el momento del sacrificio.

## **2.5.- Obtención de muestras de tumor humano para implante**

Las muestras para estudio se han tomado sobre la pieza operatoria en fresco, antes de su fijación en formol.

Un fragmento seleccionado por el patólogo, de aproximadamente 5 gr, se introduce en el medio de cultivo líquido de EARL preparado para tal fin, que contiene nutrientes y antibióticos para su conservación y para evitar la contaminación e infección [270] y se traslada a una nevera para su conservación a 4°C hasta el momento de su implante en el ratón; este tiempo no debe superar las 24 horas (normalmente no supera las 4 ó 5 horas).

## **2.6.- Sacrificio y toma de muestras del tumor desarrollado en el ratón**

Los animales son sacrificados a los 120 días. Se les realiza una laparotomía media y toracotomía amplia para exponer bien ambos compartimentos.

Se extraen las siguientes muestras:

- Sangre por punción cardiaca
- Ciego
- Riñón
- Pulmón
- Hígado
- Tumor principal
- Ganglios

La sangre se centrifuga a 1.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C y el plasma obtenido se introduce en tubos Eppendorff para ser almacenada en el congelador a -80°C.

Después de la extracción todas las muestras de tejidos se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y posteriormente se conservaron a -80°C hasta la realización de las determinaciones analíticas y los estudios inmunohistoquímicos.

Las muestras de tumor de colon destinadas a nuevos implantes fueron mantenidas a temperatura ambiente en liquido conservador para evitar su desecación. El implante se realizó inmediatamente después de la obtención de la muestra, siguiendo las mismas directrices expuestas para el implante de material procedente de CCR humano.

## **2.7.- Estudio Morfológico - Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)**

Las muestras tisulares fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Para la realización de los estudios se obtuvieron cortes de 3-5 micras que incluían las muestras tumorales y los respectivos controles que fueron desparafinados y rehidratados según los protocolos utilizados habitualmente en clínica.

Para el análisis morfológico los cortes se tiñeron con H-E.

Para la realización de las técnicas de IHQ la incubación de la mayoría de anticuerpos y reactivos fue realizada de modo automático mediante el procesador OPTIMAX PLUS (v 2.7) (A. Menarini Diagnostics, Ca, USA).

Los anticuerpos primarios utilizados para el estudio se encuentran detallados en la Tabla III.

El protocolo seguido para la realización de la técnica de IHQ fue el detallado en la Tabla IV: Sistema Polímero "vision biosistem". La recuperación antigénica varía dependiendo del Anticuerpo, existiendo dos tipos: ER-1 y ER-2 cuyo tiempo también varía según se expresa en la Tabla IV.

<b>Ac</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>	<b>Pre-trato</b>	<b>Clón</b>	<b>Técnica: protocolo</b>
p53	Novocastra (Newcastle,UK)	1:100	Citrato	Do7	RE-1
CEA	Novocastra (Newcastle,UK)	Prediluido	Citrato	12-140-10	RE-1
MIB 1	Masterdiagnostic (Ca,USA)	1:80	Citrato	Ki 67	RE-1
ALC	Novocastra (Newcastle,UK)	1:100	Citrato	RP2/18+RP2/22	RE-1
CD 20	Masterdiagnostic (Ca,USA)	1:100	Citrato	L-26	RE-2
BCL 2	Novocastra	1:80	Citrato	Bcl 2/100/D5	RE-1
CD31	Masterdiagnosis (Ca,USA)	1:35	Citrato	JC/70 <sup>a</sup>	RE-2
CD34	Novocastra (Newcastle,UK)	Prediluido	Citrato	QBEnd/10	RE-1
E-cadh	Masterdiagnostic (Ca,USA)	1:20	Citrato	36B5	RE-1
BAX	Biocare(Ca,USA)	1:100/1:200	Citrato	2-D2	RE-1
p16	Biocare(Ca,USA)	Prediluido	Citrato	JC8	RE-2
MSH 2	Biocare(Ca,USA)	Prediluido			RE-2

Tabla III: Anticuerpo utilizados con su casa comercial, dilución utilizada, clon y protocolo seguido.

\*Protocolo detallado:

Acción	T <sup>a</sup> (°C)	tiempo
Desparafinar	72°	
Alcohol		5'
Lavado		5'
Recuperación de Ag (ER-1)/(ER-2)		5'/30'
Lavado	35°	5'
Peroxidasa		8'
Lavado		5'
Ac primario		15'
Lavado		5'
Post-primario		8'
Lavado		2'
Polímero		8'
Lavado		2'
Agua destilada		5'
DAB = diaminobencidina		5'
Lavado		5'
DAB		5'
Lavado		5'
Agua destilada		5'
Hematox-eosina		9'
Agua destilada		5'
Lavado		5'
Agua destilada		5'

Tabla IV: Detalles de la técnica

Las determinaciones fueron realizadas por un observador que no conocía el origen de la muestra sobre cien campos elegidos al azar.

Los resultados de las determinaciones fueron clasificados como positivo (+) cuando la estructura correspondiente de la célula (núcleo en el caso del p53 y MIB1 y citoplasma en el resto de los casos) aparecieron teñidos de color marrón.

Se consideró resultado negativo (-) cuando el % de núcleos teñidos eran igual o menor del 10%. Para valores superiores se considero positivo estableciéndose tres grupos:

+	.....	% de núcleos teñidos entre el	11-39	%
++	.....	“ “ “ “	40-74	%
+++	.....	“ “ “ “	>75	%

## 2.7.1.- Determinación de las CAMs por Western Blot

### 2.7.1.1.- Extracción de proteínas

La extracción de proteínas tisulares se efectuó a 4°C, utilizando el siguiente tampón de lisis (1 mL por 100 mg de tejido): 140 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% NP40 ó IGEPAL CA-630; 10% glicerol; 20 mM Tris base pH 8.0, al que se añadieron inhibidores de proteasas: aprotinina y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF). Con la ayuda de un politrón (Ultra-turrax T8, IKA Labortechnik, Alemania) se procedió a la homogenización de las muestras. A continuación, el lisado tisular se centrifugó durante 25 minutos a 12000 x g a 4°C (Universal 32 R, Hettich, Alemania). Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización, una alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas.



La obtención de los extractos celulares se realizó a 4°C, se retiró el medio de cultivo con una bomba de vacío y se lavaron las placas con 3 mL de PBS frío. Se añadió 1 mL del tampón de lisis anterior, a continuación se rascaron las placas con la ayuda de rascadores y se recogió el extracto en un eppendorf. El lisado se centrifugó durante 10 minutos a 10000 x g a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización, una alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas.

#### 2.7.1.2.- Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas totales en las muestras se utilizó un kit de Bio-Rad, basado en el método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Microtest™ 96, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) utilizando 5 µL tanto para las muestras como para la recta patrón. A continuación se añadieron 25 µL del reactivo A (suplementado con 20 µL del reactivo S por cada mL reactivo A, ya que las muestras contenían detergente: IGEPAL CA-630), posteriormente se añadieron 200 µL del reactivo B. La mezcla se incubó al menos 15 minutos y se midió la absorbancia a 720 nm en un lector de placas de ELISA (ELx800, Bio-Tek Instrument Inc., VT, USA), los resultados se analizaron con el programa KC-Junior (Bio-Tek Instrument Inc., VT, USA).

#### 2.7.1.3.- Determinación de la expresión de proteínas

La separación de las proteínas mediante electroforesis se basa en el método de Laemmli. Para ello se utilizó un equipo de electroforesis (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell / Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). La cantidad de extracto tisular usado fue de 50-150 µg, y la de extracto celular de 15 µg, se mezcló con tampón de carga (1% α-mercaptoetanol, 2% dodecil sulfato sodico [SDS], 10% glicerol, 125 mM Tris pH 6.8, azul de bromofenol 0.0005% p/v), desnaturalizándose las proteínas a 100°C durante 3 minutos.

Posteriormente las proteínas se cargaron en un gel de Tris-glicina-poliacrilamida que contenía entre un 6-10% acrilamida y de un grosor variable, según el tamaño de la proteína y el volumen de muestra a cargar, también se cargó un marcador de pesos moleculares (Low / Broad range, Bio-Rad Laboratories, CA, USA o BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen Corporation, CA, USA).

La electroforesis se efectuó en tampón de electroforesis aplicando un voltaje constante de 130 V (192 mM glicina; 0.1% SDS; 25 mM Tris). Las proteínas separadas e incluidas en el gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de fluoruro de poliviniliden: PVDF (BioTrace™ PVDF, Gelman Laboratory, MI, USA) manteniendo un amperaje constante de 400 mA en tampón de transferencia (190 mM glicina, 20 mM Tris pH 8.3). Antes de su utilización la membrana se activó con metanol durante 15 segundos y posteriormente se incubó en tampón de transferencia hasta el momento de su utilización.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado (TWEEN-20 0.1% v/v; NaCl 150 mM; 20 mM Tris pH 7.5) e inmediatamente se incubó con 10 mL de tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección. La incubación con el anticuerpo primario, a la dilución adecuada y en el tampón correspondiente, se realizó durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente, o durante toda una noche a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado, y posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario, a la dilución adecuada, durante 30 minutos. Al terminar se hicieron otros 3 lavados de 7 minutos con tampón de lavado.

La detección de las bandas específicas de las distintas proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia, para lo cual se utilizó una mezcla de unas soluciones de revelado comercial (Amersham Biosciences, UK) en una proporción 1:1, se mantuvo en agitación constante durante 1 minuto a temperatura ambiente y a continuación se desechó la solución de revelado.

Seguidamente se puso en contacto la membrana con una película FUJIFILM (Fuji Medical X-Ray Film, Super RX, Japón) y se realizó la correspondiente autorradiografía. Por último, se digitalizó la autorradiografía con un escáner (hp scanjet 2300c, Hewlett-Packard, Canada) utilizando el programa de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop 7.0, cuantificándose la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa NIH Image V1.61.

Después de cada determinación, se realizó un “*stripping*” con una solución comercial (Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution, Chemicon International, CA, USA), para posteriormente cuantificar la  $\alpha$ -tubulina, que se utilizó como control de carga.

Estudiamos las siguientes moléculas de adhesión celular: P-selectina, PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 utilizando anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology (Ca,USA)

#### 2.7.2.- Determinación del ritmo de producción del anión superóxido (ASO)

La técnica, que es modificación de la descrita por Forman y Beveris [271] para mitocondrias, se basa en la reducción del citocromo C por el  $O_2^-$ . Esta reducción del citocromo C no es, naturalmente, específica para el  $O_2^-$ . Esta especificidad es conferida por el uso de SOD, para lo cual el  $O_2^-$  es el único sustrato conocido. De acuerdo con esto, el ensayo se realiza con y sin SOD, y únicamente la reducción del citocromo C inhibida por SOD se usa para calcular la producción de superóxido. Esta reducción del citocromo C se sigue espectrofotométricamente a 550 nm de  $\lambda$ . Precisamos los siguientes reactivos:

- 1.- Tampón fosfato-potásico 0,1 M+0,1 mM EDTA ; pH 7,8.
- 2.- Citocromo C 75  $\mu$ M.
- 3.- SOD (aproximadamente 240 U).

La lectura espectrofotométrica se realizó a 550nm de  $\lambda$ ; pH 7,8 y temperatura de 25° C durante 1 minuto con intervalos cada 6 seg., en cubetas

de 1 ml, con un paso de luz de 1 cm. Nuestros resultados se expresaron en nmol de  $O_2^{\cdot-}$  / mg prot. / min. El incremento de unidades de absorbancia en la mezcla de la reacción se convierte en nmol de ASO con el coeficiente de extinción molar:  $\Delta E_{550} / 21,0 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$

Esta conversión depende del supuesto de que el citocromo C en la cubeta de referencia está totalmente oxidado y, por tanto, de que el incremento de absorbancia observada representa únicamente la absorbancia del producto reducido ( $\Delta$  absorbancia: reducido - oxidado). Tras el establecimiento de las condiciones óptimas, exponemos a continuación el esquema de desarrollo del experimento. En la cubeta de referencia se añadieron 100  $\mu$ l de citocromo C (75  $\mu$ M), 20  $\mu$ l de SOD (aproximadamente 264 U) y 25  $\mu$ l de muestra. La diferencia de volumen hasta 1.000  $\mu$ l se completó con tampón fosfato potásico + EDTA. En la cubeta de referencia se sustituyó el volumen de tejido por uno equivalente de tampón. Se registró la lectura a 550 nm de  $\lambda$  en 2 fases:

1º.- Reducción del citocromo C inespecífica: sin SOD.

2º.- Reducción del citocromo C independiente del superóxido: con SOD.

La pendiente máxima se registró en el primer minuto. La temperatura fue de 25° C y pH de 7,8.

### 2.7.3.- Determinación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$

Para la determinación del TNF- $\alpha$  utilizamos un kit comercial (Factor-Test-mouse TNF- $\alpha$  Elisa Kit de Genzyme Immunobiologicals MA, USA) basado en la técnica de ELISA específico para ratón. El sistema de medición fue un lector de placas (Gest, General Elisa System Technology, MENARINI Ca,USA) para la técnica de ELISA automático.

Es un kit ELISA que emplea múltiples anticuerpos con el principio de "sándwich". En primer lugar se utilizó un plato con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  adherido en cada uno de ellos para capturar el TNF- $\alpha$

presente en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos junto con los blancos correspondientes. Después de lavar el plato para eliminar el material no adherido se añadió una peroxidasa conjugada policlonal anti-TNF- $\alpha$ . A continuación el plato fue lavado de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato que inició la catalización de la peroxidasa. El cambio de color se detuvo por acidificación.

La absorbancia fue medida en un lector de placas (Gest, General Elisa System Technology, MENARINI, Ca, USA) a 450nm  $\lambda$  siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de TNF- $\alpha$  de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

#### 2.7.4.- Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 11.

El análisis descriptivo de las variables cuantitativas se expresa como media y desviación estándar y las cualitativas como frecuencias y porcentajes

Para una comprensión visual los datos cuantitativos se han representado utilizando diagramas de caja (box-Plot) que representan la media, la desviación estándar y los valores extremos.

La comparación de los grupos se ha efectuado utilizando el test de t de Student o el de la U de MNN-Witney de acuerdo con la normalidad de la distribución de las variables.

La comparación de variables cualitativas se ha realizado mediante el test de la Xi cuadrado.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el nivel alfa resulto menor de 0.05.

## **VI. RESULTADOS**

## **1.- Análisis bibliográfico**

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en MEDLINE en los tres últimos años introduciendo como palabras clave: EXPERIMENTAL COLON CANCER, CELL LINES, IMPLANTATION MODEL, ORTHOTOPIC MODEL Y CARCINOGEN INDUCED CANCER.

Se analizaron 244 publicaciones, de las cuales 235 eran artículos originales que han constituido la base de nuestro análisis.

Predomina el uso de modelos in vivo (73% de las publicaciones) frente al 27% que utilizaron modelos de cultivos de líneas celulares.

El animal más utilizado fue el ratón inmunológicamente normal en el 57% de los casos, frente al 42% de los estudios que utilizaron ratones desnudos.

El modo de inducción del cáncer, fue utilizando sustancias químicas sólo en el 13% de los estudios. En los estudios que utilizaron material biológico (células o tejidos), éste procedió de cáncer humano en el 69% de los casos. En el 31% de los casos el material procedía de cáncer de ratón.

El material biológico fue implantado ortotópicamente en el 18% de los casos y heterotópico (principalmente subcutáneo) en el 87% de los estudios.

Finalmente, el objetivo declarado de los estudios fue mayoritariamente (62% de las publicaciones) el estudio de nuevos medicamentos.



## **2.- Resultados de la implantación y supervivencia**

Se realizó implante de tejido tumoral humano en 20 animales con una mortalidad del 30% (Grupo I) (Tabla V). En 1 de los animales supervivientes tras recibir el primer implante, no se encontró tumor macroscópicamente. En otros 3, no se encontró tumor tras el análisis histológico de la pared del ciego. Ambos animales fueron retirados del estudio.

El porcentaje de implantes positivos tras comprobación histológica fue del 71%.

Muestras obtenidas de estos tumores implantados fueron reimplantadas de nuevo en 18 animales (GRUPO II) (2º implante) con una mortalidad 33% (Tabla V). 4 animales fueron retirados del estudio (no se pudo encontrar tumor en el análisis histológico en 3 de ellos y en 1 no se pudo disponer de muestra histológica por un error del procesado de la misma).

Por lo tanto, el estudio se ha realizado sobre 10 animales en el primer implante y 8 en el segundo implante. (Tabla VI)

GRUPO	SUPERVIVENCIA		MORTALIDAD		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
GRUPO I Primer implante	14	70	6	30	20	100
GRUPO II Segundo implante	12	66	6	33	18	100

Tabla V: Muestras obtenidas

GRUPO	Nº animales estudiado	Implante +	%
GRUPO I Primer implante	14	10	71
GRUPO II Segundo implante	12	8	66

Tabla VI: animales estudiados

### **3.- Resultados del estudio histológico y del análisis por IHQ**

Todos los tumores implantados reproducían fielmente el cuadro histológico del tumor primitivo aunque con menor vascularización y en todos ellos se aprecian fenómenos de necrosis. Por supuesto, en ninguno de ellos se observaban signos de reacción inflamatoria (Figuras 1 a 8).

El análisis IHQ del tumor primitivo encontró que sólo expresaba el MIB<sub>1</sub>, CEA, MSH<sub>1</sub>, MLH<sub>1</sub>, MSH<sub>6</sub> y ALC (Tabla VII)

El análisis IHQ de los tumores obtenidos por implante muestra resultados superponibles a los obtenidos en el tumor primario. La tinción para ALC resultó negativa (Figuras 9 a 20).

El segundo pase en animal de experimentación tampoco modifica los resultados del análisis IHQ, salvo para el MIB<sub>1</sub> que muestra valores significativamente menores en el segundo implante (Tabla VIII)

	p53	CEA	MIBI	ALC	CD20	BCL2	CD31	CD34	E-cad	MLH <sub>1</sub>	MSH <sub>2</sub>
Cáncer Humano	-	+++	++	+	++	-	-	-	-	+	+
1 <sup>er</sup> Implante	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
2 <sup>o</sup> Implante	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla VII: análisis IHQ del tumor primitivo

	MIB1	CEA	MSH <sub>2</sub>	MLH <sub>1</sub>
Cáncer Humano	2	3	1	1
1er Implante	1.69 ± 0.45	3	1	1
2º Implante	1.19 ± 0.45 *	3	1	1

(\*) (V=13.5; p=0.042)

Tabla VIII: resultados del análisis IHQ

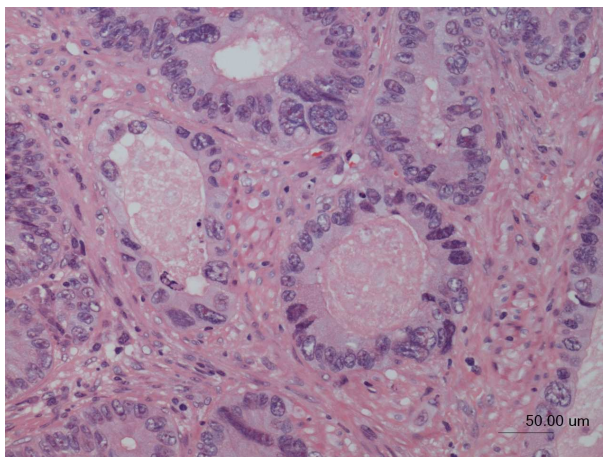


Figura 1: Aspecto histológico del tumor humano. ADC bien diferenciado de colon (T3N0M0) (HE x20)

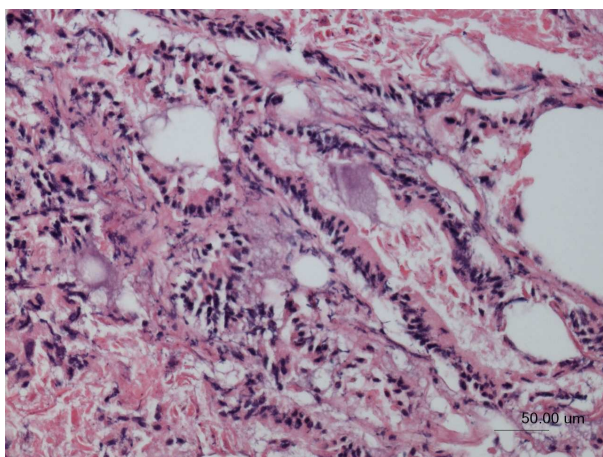


Figura 2: Aspecto histológico del tumor del 1<sup>er</sup> implante (HE x20)

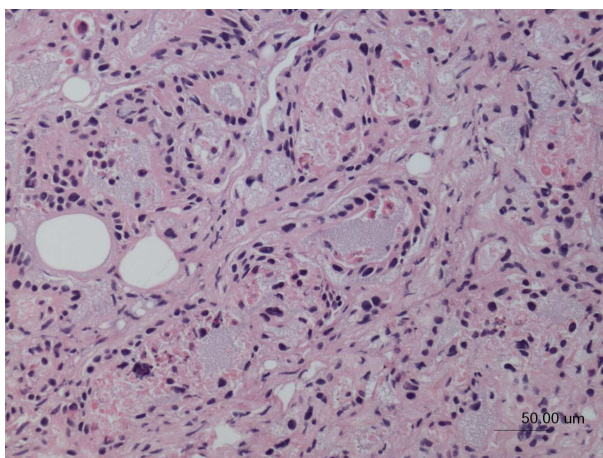


Figura 3: Aspecto histológico del tumor del 2<sup>o</sup> implante (HE x20)

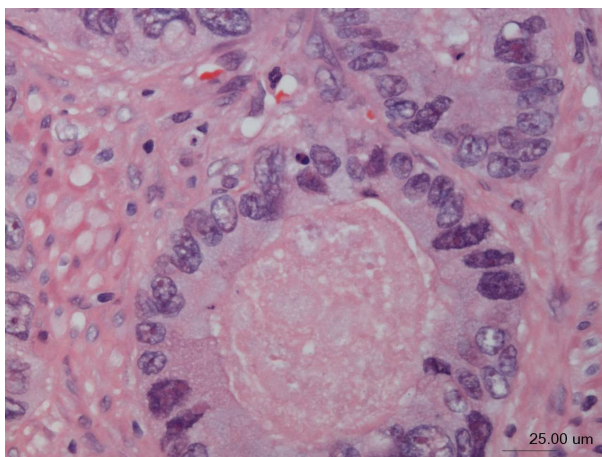


Figura 4: Aspecto histológico del tumor humano. ADC bien diferenciado de colon (T3N0M0) (HE x40)

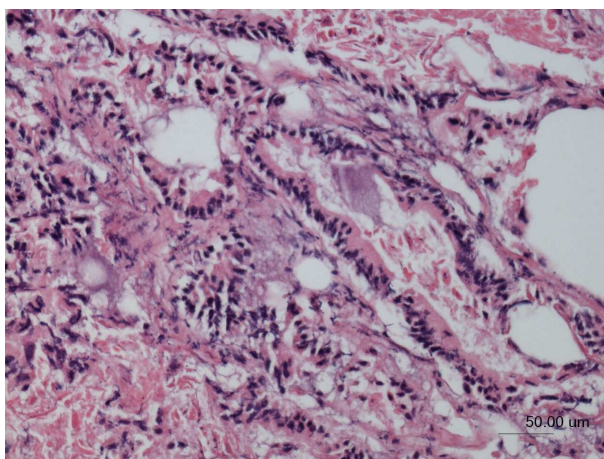


Figura 5: Aspecto histológico del tumor del 1<sup>er</sup> implante (HE x40)

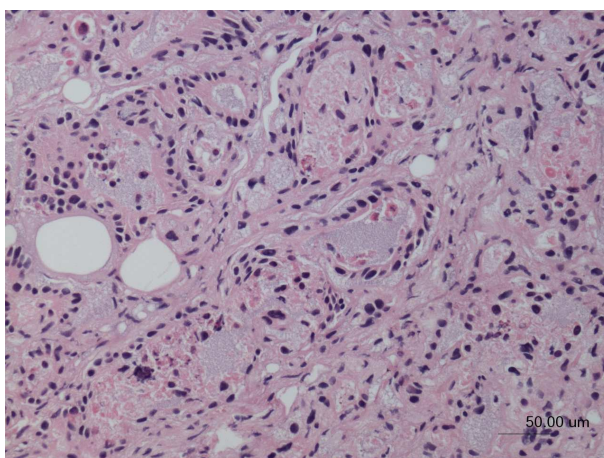


Figura 6: Aspecto histológico del tumor del 2<sup>o</sup> implante (HE x40)

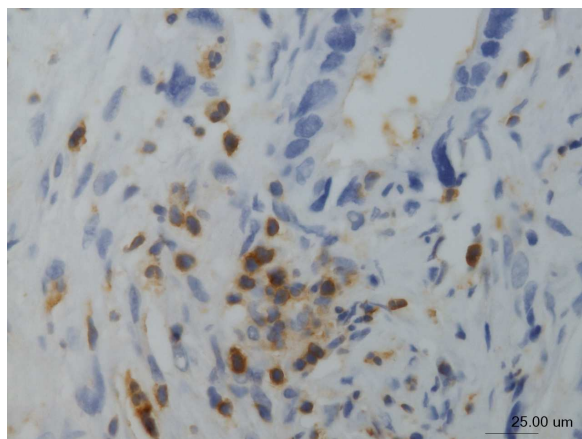


Figura 7: ADC de colon humano con células positivas para el ALC (x40)

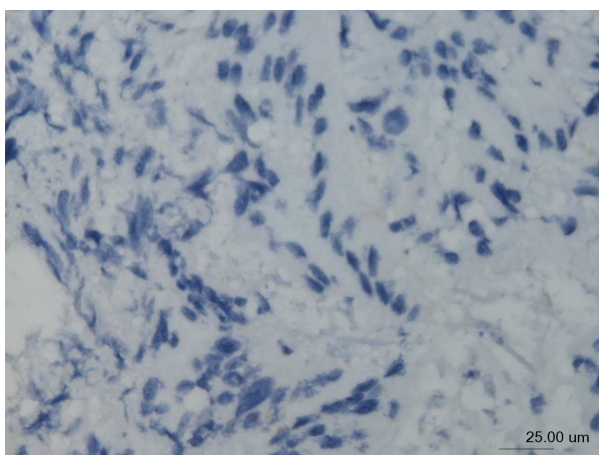


Figura 8: ADC de colon obtenido por implante en ratón negativo para el ALC (x40)



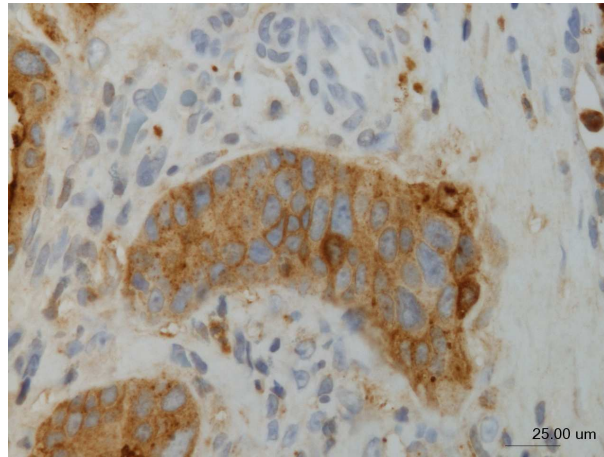


Figura 9: ADC bien diferenciado de colon humano (T3N0M0). Células positivas para el CEA (x40)

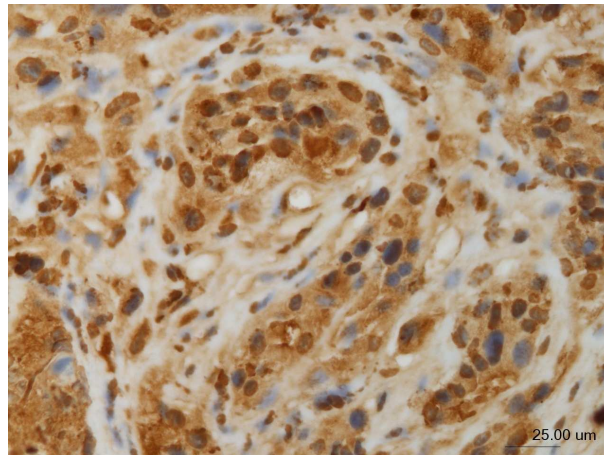


Figura 10: ADC de colon obtenido tras el 1<sup>er</sup> implante, positivo para CEA (x40)

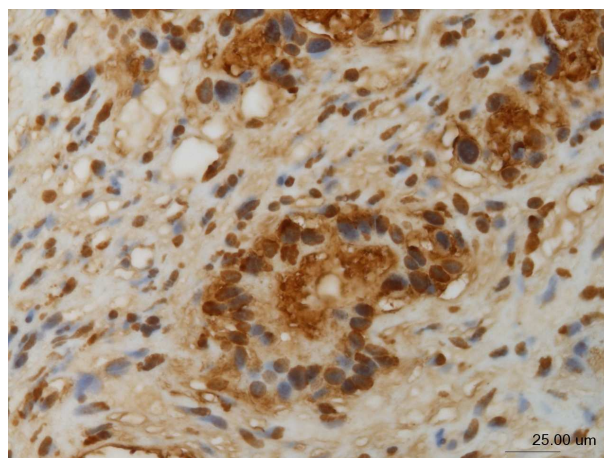


Figura 11: ADC de colon obtenido tras el 2<sup>o</sup> implante, positivo para CEA (x40)

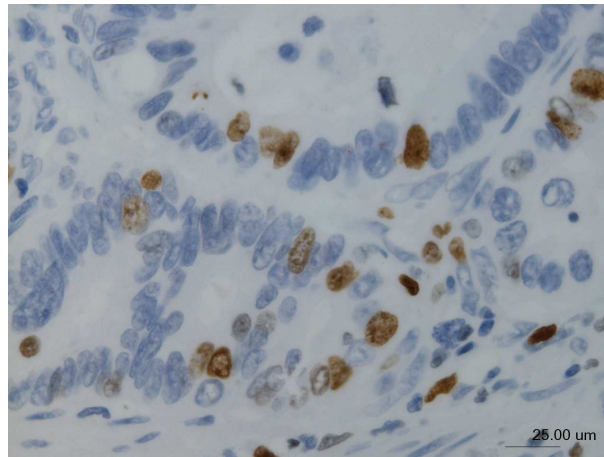


Figura 12: ADC bien diferenciado de colon humano (T3N0M0). Células positivas para el MIB1 (ki67) (x40)

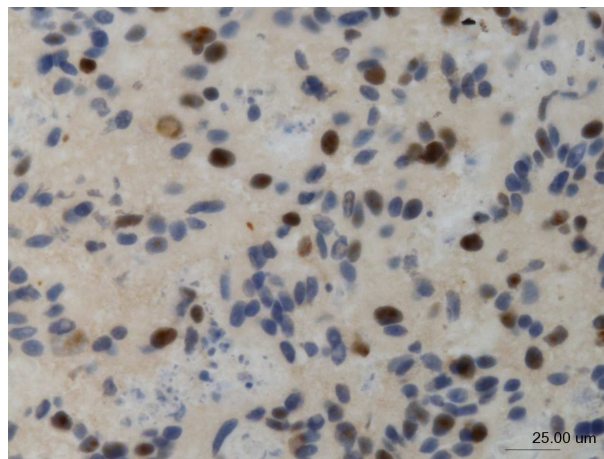


Figura 13: ADC de colon obtenido tras el 1<sup>er</sup> implante, positivo para MIB1 (ki67) (x40)

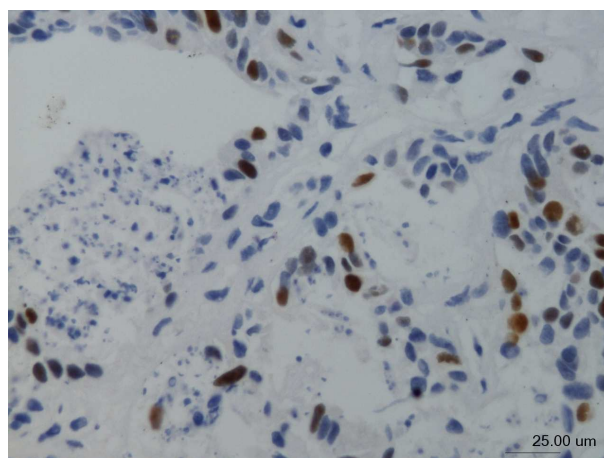


Figura 14: ADC de colon obtenido tras el 2<sup>o</sup> implante, positivo para MIB1 (ki67) (x40)

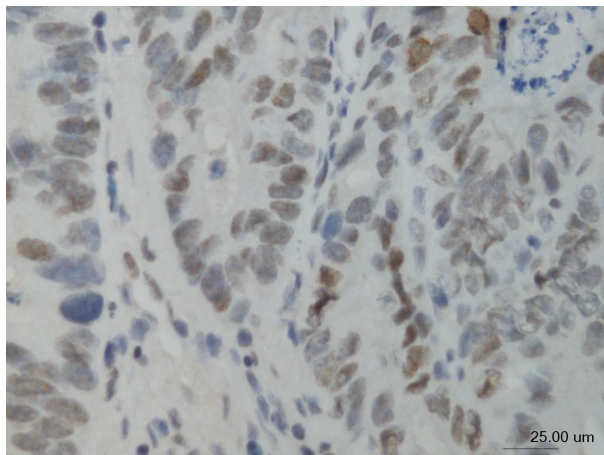


Figura 15: ADC bien diferenciado de colon humano (T3N0M0). Células positivas para el MLH<sub>1</sub> (x40)

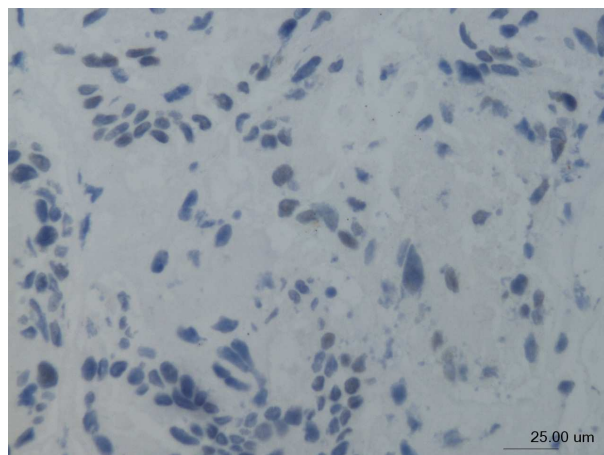


Figura 16: ADC de colon obtenido en el ratón, negativo para MLH<sub>1</sub> (x40)

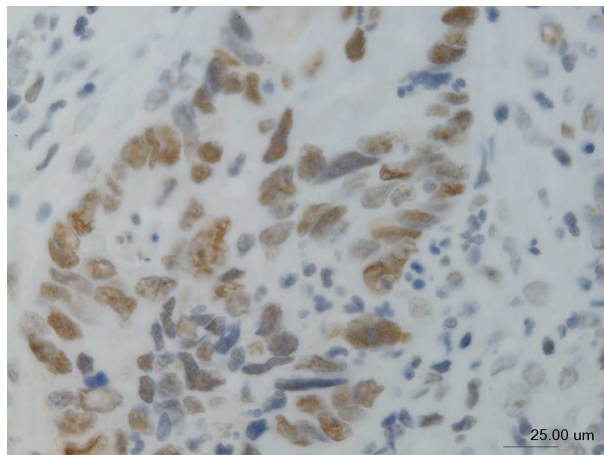


Figura 17: ADC bien diferenciado de colon humano (T3N0M0). Células positivas para el MSH<sub>2</sub> (x40)

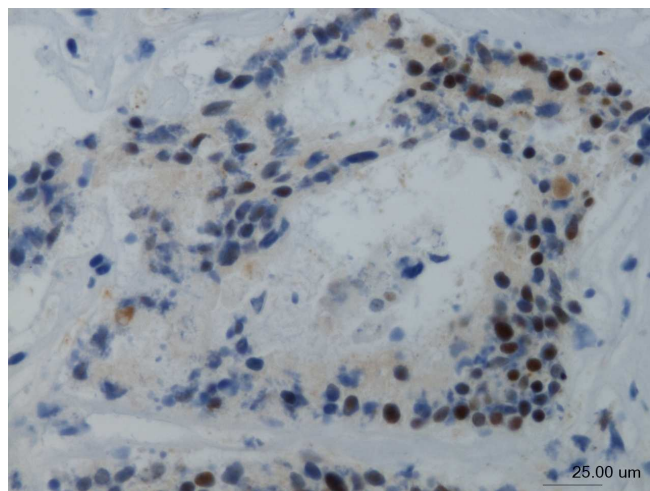


Figura 18: ADC de colon obtenido en el ratón, negativo para MSH<sub>2</sub> (x40)



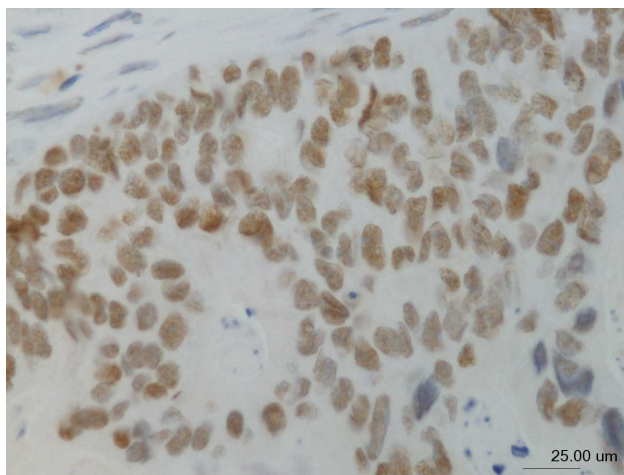


Figura 19: ADC bien diferenciado de colon humano (T3N0M0). Células positivas para el MSH<sub>6</sub> (x40)

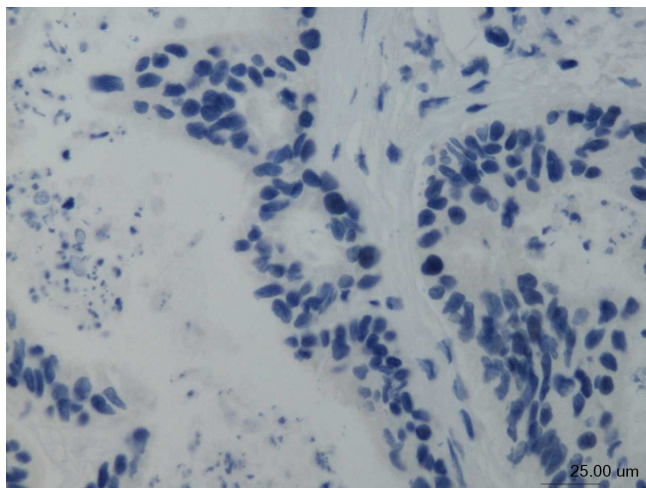


Figura 20: ADC de colon obtenido en el ratón, negativo para MSH<sub>6</sub> (x40)

#### 4.- Resultados de la determinación de las CAMs

Los resultados de la determinación de las CAMs se representan en las Tablas IX a XII y en la Figuras 21 a 24.

VCAM	N	Media	Std. Deviation	Std. Error Media
Cáncer Humano	372			
1 <sup>er</sup> IMPLANTE	10	332,2	123,4	39,0
2º IMPLANTE	8	404,9	180,2	63,7

Tabla IX: VCAM

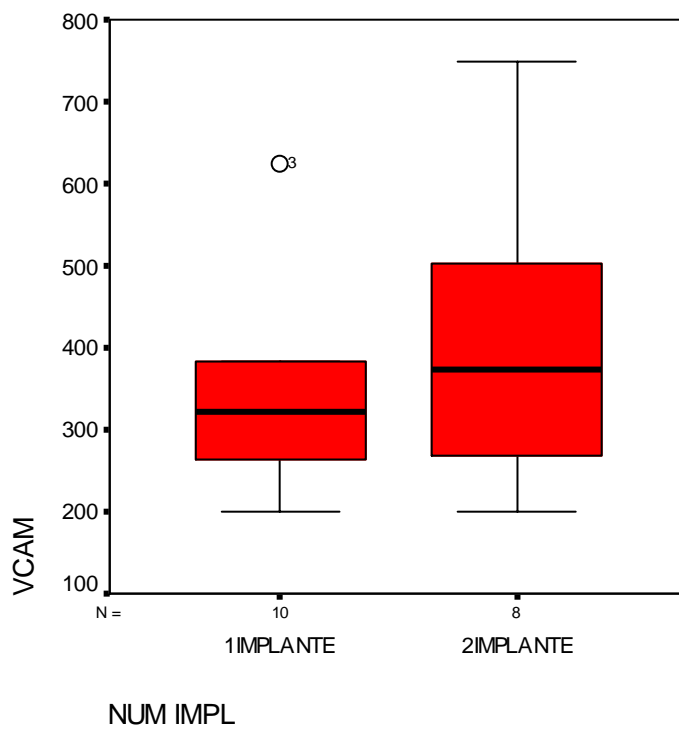


Figura 21: VCAM

PCAM	N	Media	Std. Deviation	Std. Error Media
Cáncer Humano	257			
1 <sup>er</sup> IMPLANTE	10	244,0	69,8	22,1
2 <sup>o</sup> IMPLANTE	8	247,5	74,9	26,5

Tabla X: PCAM

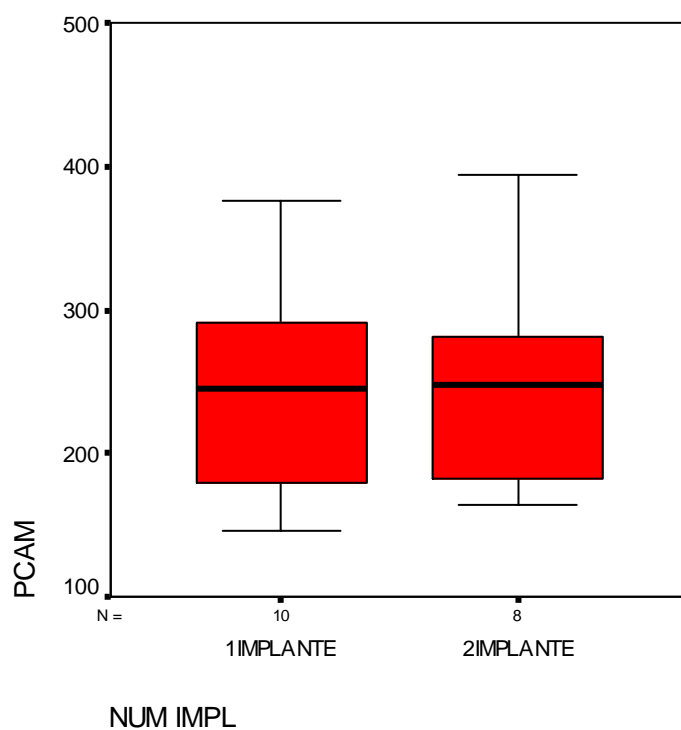


Figura 22: PCAM

PSELECTINA	N	Media	Std. Deviation	Std. Error Media
Cáncer Humano	105			
1 <sup>er</sup> IMPLANTE	10	139,7	20,9	6,6
2 <sup>o</sup> IMPLANTE	8	143,5	32,7	11,6

Tabla XI: PSELECTINA

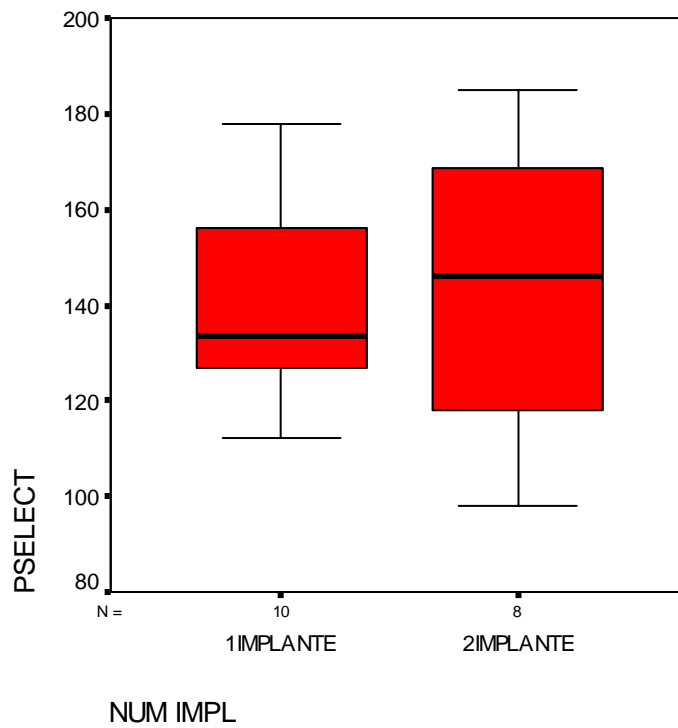


Figura 23: PSELECTINA



ICAM	N	Media	Std. Deviation	Std. Error Media
Cáncer Humano	445			
1 <sup>er</sup> IMPLANTE	10	385,7	202,4	64,0
2 <sup>o</sup> IMPLANTE	8	675,9	237,4	83,9

Tabla XII: ICAM

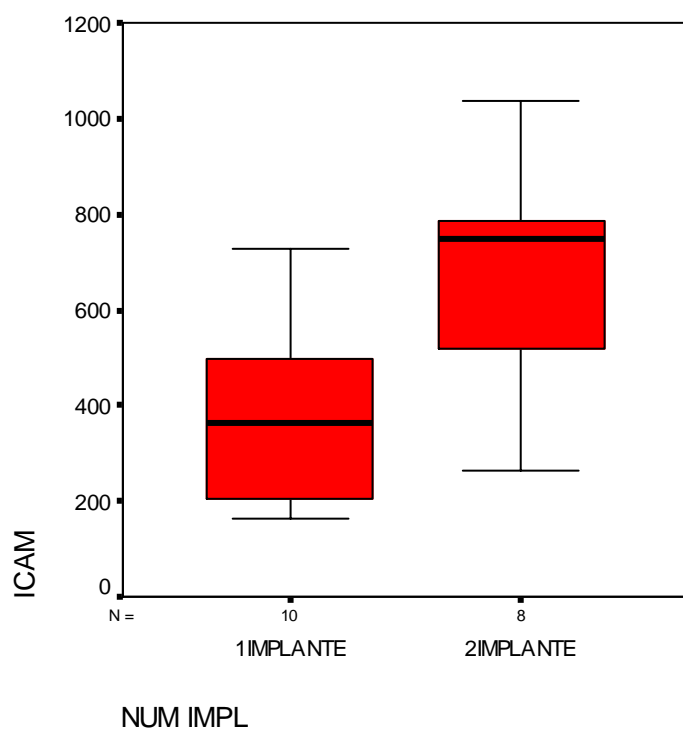


Figura 24: ICAM

En la Tabla XIII se representan los valores resultantes de la comparación estadística de los obtenidos tras el primer y segundo implante.

A excepción de los valores de ICAM, que aparecen significativamente más elevados tras el segundo pase de las células tumorales en el animal, los demás valores se mantienen sin diferencias estadísticamente significativas.

	t	p
VCAM	1.01	0.32
PCAM	0.1	0.9
PSELECTINA	0.3	0.76
ICAM	2.8	0.01

Tabla XIII: valores resultantes de la comparación estadística

## 5.- Resultados de la determinación de ASO

Los resultados de la determinación del ASO se representan en la Tabla XIV y en la Figura 25.

La comparación de los valores obtenidos tras el primer y segundo implante no objetiva la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $t= 1,27$ ;  $p=0,22$ ).

ASO	N	□ ± Std. Deviation	Signif
Cáncer Humano	64,1		
1 <sup>er</sup> IMPLANTE	10	461 ± 397,5	t= 1,27
2 <sup>o</sup> IMPLANTE	8	283.3 ± 171,9	p= 0,22

Tabla XIV: ASO

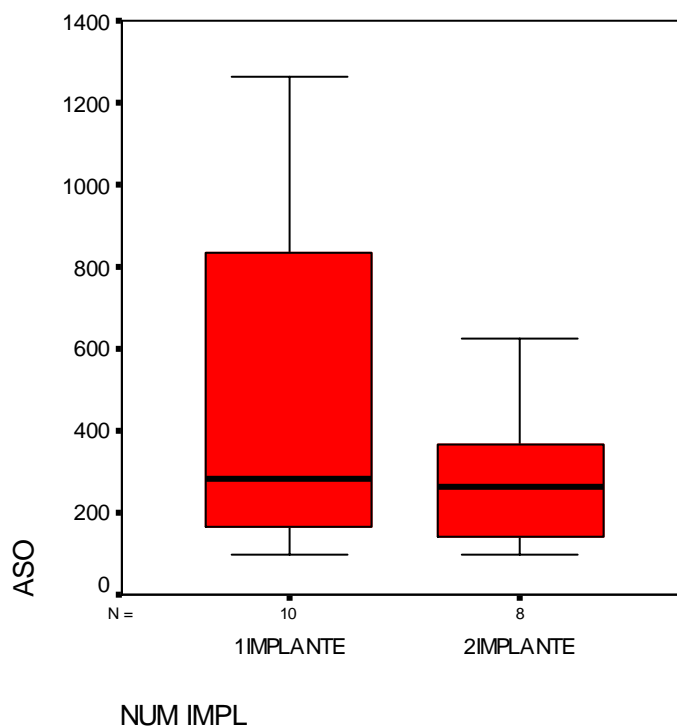


Figura 25: ASO

## 6.- Resultados de la determinación de TNF

Los resultados de la determinación del TNF se representan en las Tabla XV y en la Figura 26.

La comparación de los valores obtenidos tras el primer y segundo implante no objetiva la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $t= 1,55$ ;  $p=0,14$ )

Group Statistics

TNF	N	□ ± Std. Deviation	Signif
Cáncer Humano		762,1	
1 <sup>er</sup> IMPLANTE	10	813,3 ± 290,1	t= 1,55
2 <sup>o</sup> IMPLANTE	8	592,6 ± 311,6	p= 0,14

Tabla XV: TNF

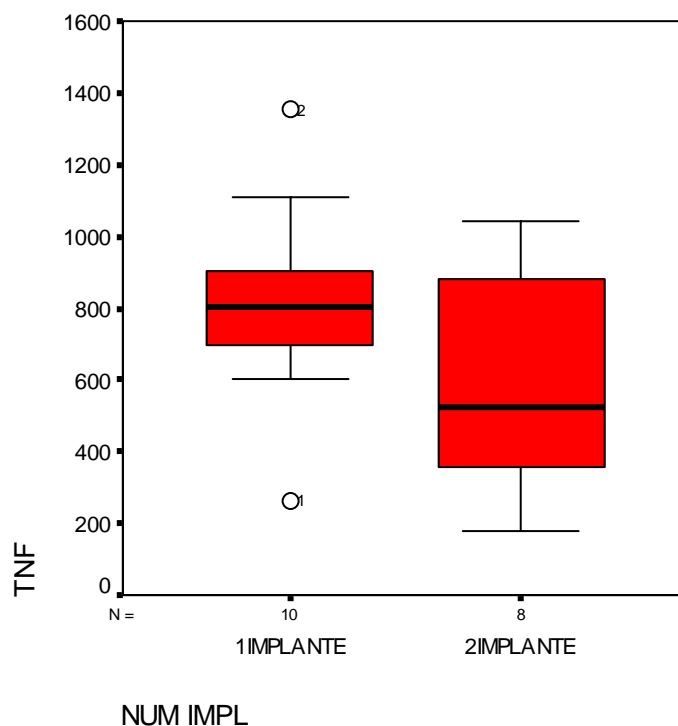


Figura 26: TNF

## **VII. DISCUSIÓN**

## **1- Discusión de los modelos de provocación de CCR experimental**

A pesar de que se han desarrollado muchos modelos animales para poder realizar el estudio de las distintas características del CCR, ninguno de ellos imita totalmente las características del CCR humano.

Todos los modelos tienen sus ventajas y limitaciones y es de gran importancia conocerlas, pues se debe elegir el modelo óptimo para resolver cada cuestión específica.

El modelo animal ideal debe replicar fielmente todos los aspectos del tumor desarrollado en el hombre. Esto incluye la adquisición de alteración genética, con los cambios subsiguientes en comportamiento celular y biología tumoral. Además debe tener potencial de provocar metástasis e idealmente conservarse la característica de sensibilidad a la terapéutica [272].

Por otra parte, el modelo tumoral debe ser práctico, es decir, el tumor debe ser predecible y consistente, con una alta incidencia de afectación en animales en un estrecho margen de tiempo [12].

#### 1.1.- Consideraciones generales sobre el uso de animales para modelos experimentales de CCR.

En los animales existen evidentes diferencias en la duración de la vida, peso corporal, morfología y flora intestinal, tipo y características de la ingesta. Estas diferencias hacen que los datos obtenidos de modelos de cáncer en ratón precisen una cuidadosa interpretación cuando queremos extrapolar los resultados a la clínica.

Un punto que merece atención en la carcinogénesis, es el factor edad, ya que el cáncer es predominantemente una enfermedad de la vejez. En contraste, las células se dividen menos frecuentemente en los ratones ancianos, lo que probablemente hace que los ratones tengan menos susceptibilidad de iniciación tumoral y de progresión. Un estudio en un modelo de ratón Min/+ reveló que los ratones jóvenes eran más susceptibles de carcinogénesis colorrectal inducida por AOM que los ratones ancianos [273].

El desarrollo del cáncer en animales puede ser influenciado por un gran número de sustancias [27] y de hecho, se ha puesto de manifiesto que sólo con dieta puede inducirse cáncer en roedores [274]. Los componentes de la dieta pueden ser carcinogénicos [275], o pueden producir mecanismos de defensa celular [276]. Así mismo, las restricciones dietéticas pueden tener un efecto anticarcinogénico [277].

La actividad física limitada posiblemente incrementa la incidencia de malignización colorrectal [278]. La diferente vida media del ratón respecto al humano también puede interferir en la interpretación de los resultados obtenidos con drogas de acción citostática [13].



Existen importantes diferencias en la farmacocinética de determinados productos entre el ratón y el humano referidas a la unión de las mismas con proteínas plasmáticas y a los enzimas que las metabolizan en el hígado [279-283].

Otro aspecto importante, son los telómeros, estructuras en el extremo del cromosoma que le protegen contra daños. En su acortamiento o ausencia tiene lugar la apoptosis [284]. La actividad telomérica previene el acortamiento telomérico haciendo inmortales a las células. Los humanos no tenemos formación telomérica en nuestras células, en contraste con los ratones. Eliminando los genes que encodan la enzima telomerasa (ratones  $terc^{-/-}$ ) se pueden crear modelos de ratón con telómeros parecidos a los humanos [284].

#### 1.1.1.-Modelos de CCR espontáneos e inducidos químicamente

Estos modelos son los que primero se describieron. La formación espontánea de CCR en ratones ocurre con una incidencia menor al 1% [20, 21], por lo que es imposible realizar estudios experimentales de desarrollo de CCR. Aunque se realicen en ratones propensos a desarrollar CCR, la enfermedad aparece en edades avanzadas y la predictibilidad y reproductibilidad del tumor es insuficiente para el uso experimental. Por añadidura, en esos ratones la formación de metástasis ocurre sólo esporádicamente.

Para incrementar la incidencia de CCR, se desarrollaron nuevos modelos en ratones que fueron expuestos a carcinógenos. La mayoría de estos compuestos causan neoplasias en múltiples órganos, pero algunos inducen predominantemente CCR. Los carcinógenos más frecuentemente usados son DMH y sus metabolitos AOM, MNNG y MNU [23].

La incidencia de desarrollo de CCR depende del carcinógeno usado, de la dosis, vía de administración y duración de la exposición al agente. Un aspecto que con frecuencia no se tiene en cuenta es que la flora intestinal, la dieta y el estado inmunológico de los ratones pueden interferir con el

metabolismo de los compuestos carcinogénicos y de ese modo influir en su concentración local efectiva.

DMH y AOM pueden ser administrados por cuatro vías: oral, subcutánea, intrarrectal e intramuscular. La dosis oral de DMH en ratas induce una baja incidencia tumoral (14 al 30%). La administración subcutánea de DMH o AOM induce una incidencia tumoral variable desde el 0 al 100%. La administración intrarrectal de DMH induce rápida hiperplasia y lesiones preneoplásicas en el colon tras 34 semanas. Repetidas inyecciones intramusculares de AOM inducen una incidencia del 80% de CCR tras 12 semanas. Dosis orales de actuación directa de MNU induce tumores a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, con un detrimento de la incidencia desde el estómago al recto. La administración intrarrectal de MNU produce un tumor de colon con incidencia del 100%. Por otra parte, se desarrollaron metástasis en un 23 a 31% de los ratones [285].

Esta baja incidencia de tumor constituye otro inconveniente del CCR inducido por carcinógenos ya que obliga a utilizar muchos animales en los estudios.

Por otra parte, el sexo, la edad y el contexto genético de los ratones deben afectar a la incidencia del desarrollo del CCR, aunque su influencia no es bien conocida.

Lo ideal es que todas estas variables sean estandarizadas para obtener un protocolo con el cual el desarrollo del CCR pueda ser inducido y reproducido.

En cualquier caso, estos modelos no son adecuados para estudiar formación de metástasis, pues se desarrollan muy lentamente y con poca frecuencia. Sin embargo, los modelos de CCR inducido por carcinógenos son ideales para estudios de la influencia de la dieta en el desarrollo tumoral.

En la revisión efectuada por nosotros, este modelo fue utilizado en el 13% de los artículos publicados

#### 1.1.2.- Modelos experimentales inducidos en animales modificados genéticamente

Los animales con déficit de inmunidad son ampliamente utilizados. Como es lógico, son particularmente útiles en los modelos de implantación de material heterólogo (fragmento de tumor o de cultivos celulares procedentes de cáncer humano) en situación ortotópica o heterotópica.

Para prevenir el rechazo del xenoinjerto, se utilizan ratones desnudos o con marcada inmunodeficiencia combinada (SCID). En los ratones desnudos el gen Nu está eliminado, resultando ratones sin pelo y sin timo, sin poder generar linfocitos T.

Los ratones SCID presentan alteración de la maduración de linfocitos y un déficit en la circulación, maduración y función de células T y B [22]. En contraste con su carencia de adaptación inmunológica, los ratones SCID poseen un sistema inmune completamente intacto innato, con un número normal de macrófagos, células NK y granulocitos.

La activación del sistema inmune innato en ratones SCID es responsable de una respuesta inmune compleja contra xenoinjertos humanos. La respuesta del anfitrión contra injerto puede variar considerablemente entre ratones y, por tanto, variar entre muestras desde diferentes tumores. Por eliminación selectiva de muestras tumorales o por bloqueo de la reacción anfitrión contra injerto, la variabilidad puede ser reducida.

Los modelos de ratón de ingeniería genética constituyen un paso más y han sido usados, en principio, para determinar si un gen en particular está envuelto en la patogénesis del cáncer o si un producto genético, a través de su participación en procesos de señalización específicos, contribuye al cáncer en combinación con estas condiciones predisponentes.

Estos pueden ser transgénicos, que constitutivamente expresan un oncogén en uno o más tejidos u órgano, dependiendo del promotor empleado, y Knk, animales que presentan las mutaciones de las células germinales (Tabla XVI).

Modelo	Ventajas	Inconvenientes
Transgénico convencional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las alteraciones genéticas se inducen en determinados tejidos en el momento deseado</li> <li>• Los tumores se inician y se desarrollan in vivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las alteraciones genéticas están presentes en muchas células de modo inicial</li> <li>• La expresión genética puede no ser parecida a los tumores convencionales</li> <li>• El microambiente tumoral es diferente</li> <li>• La combinación de alteraciones genéticas puede afectar la viabilidad</li> </ul>
Knockouts	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las alteraciones genéticas están presentes en las células germinales</li> <li>• Los tumores se inician y se desarrollan in vivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las alteraciones genéticas están presentes en todas las células en la embriogénesis</li> <li>• Difícil diferenciar los efectos de estas alteraciones en la embriogénesis o en la carcinogénesis</li> <li>• La expresión genética puede no ser parecida a los tumores convencionales</li> <li>• El microambiente tumoral es diferente</li> <li>• La combinación de alteración genética puede afectar la viabilidad</li> </ul>

Tabla XVI: diferencias entre modelos transgénicos y Knk

Ambos modelos nos han permitido avanzar en el conocimiento de la tumorigénesis y de los genes implicados en ella.

Pero estos modelos también tienen inconvenientes:

Los modelos transgénicos, habitualmente tienen un promotor heterólogo, lo que provoca que tengan niveles no fisiológicos de expresión de las proteínas que codifican los genes. Los Knk presentan las alteraciones en todas las células desde la embriogénesis, mientras que los transgénicos, dependiendo del promotor empleado en su obtención, pueden expresar el oncogén en muchas células de modo más o menos precoz.

La existencia de estas alteraciones genéticas puede afectar a la embriogénesis y actuar como factor de confusión.

Además, el microambiente que rodea al tumor es diferente en ambos modelos del que rodea a los tumores humanos: Las alteraciones genéticas están en todas las células en el KnK y en muchas células en los transgénicos, mientras que en los tumores humanos, la mutación aparece en unas pocas células que están rodeadas por celular normales en el inicio.

Con el desarrollo de las técnicas de manipulación genética, ha sido además posible generar tumores específicos con alta incidencia en una estrecha ventana de tiempo [83, 84, 286, 287]. Estos modelos producen nuevas oportunidades de establecer la influencia de genes específicos y de sus combinaciones en la iniciación y progresión del cáncer y para el estudio de drogas que interfieren específicamente con las vías mutadas de regulación del crecimiento tumoral [286].

Debido a que el desarrollo del CCR en estos modelos no es predecible y rara vez desarrollan metástasis, estos no son usados a menudo en ensayos con drogas [12].

A pesar de sus deficiencias, estos modelos pueden ser usados para estudiar los efectos de intervenciones terapéuticas precoces en el proceso de cancerogénesis o medidas preventivas. Por ejemplo, un estudio demostró una significativa disminución del tamaño de los tumores producido por antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en el intestino delgado de ratones Min.

Esto está en concordancia con estudios epidemiológicos proponiendo qué AINE puede disminuir la incidencia de CCR en humanos [10].

El potencial de esta aproximación puede ser ilustrada por un experimento con células tumorales con c-myc ampliada, expresión y p53 “tipo-salvaje” es susceptible de 5-FU, en contraste con células tumorales con un gen p53 mutado. De acuerdo con estos signos, análisis retrospectivos de una fase clínica III en proceso, demostró que sólo pacientes con tumores contenían expresión amplificada de c-myc y p53 respondiendo a la terapia con 5-FU [78].

Desventajas de estos modelos, son la insuficiente expresión en la presencia del inductor (pobre inductibilidad) o expresión no deseada en la ausencia del inductor (fugado) [287].

Más difícil es el desarrollo de modelos con progresión tumoral. Es difícil saber por qué el ratón no desarrolla metástasis. Esto puede ser debido, entre otros factores, a la corta vida media de los ratones, a las diferencias en el microambiente que rodea al tumor o a su sistema inmune. El problema de la longitud y regulación de los telómeros ha sido estudiado por Rudolph [288]. En contraste con las células del ratón, las células humanas tienen telómeros cortos y no expresan telomerasa. Rudolph ha conseguido un ratón con telómeros cortos que presentan múltiples adenomas microscópicos pero que no progresan a adenomas macroscópicos.

La activación de la telomerasa es un rasgo común en estadios avanzados de los tumores humanos. Por ello, el disponer de un ratón con la telomerasa activada en el curso del crecimiento tumoral sería de gran interés [289, 290]. Sin embargo, estudios posteriores parecen sugerir que las

características de los telómeros en el ratón no influyen en la génesis de las metástasis [291].

En nuestra revisión, el 42% de las publicaciones se ha realizado con este modelo

## 1.2.- Modelos de implantación

El material tumoral de procedencia humana (xenoinjerto) o de animal (aloinjerto) puede ser implantado en ratones receptores (Tabla XVII).



Modelo	Ventajas	Inconvenientes
Tumor singénico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fáciles de replicar</li> <li>• Crece en un estroma endógeno</li> <li>• Sistema inmune intacto</li> <li>• Si se implanta subcutáneo, es fácil de controlar</li> <li>• Algunos modelos hacen metástasis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células de ratón</li> <li>• El cultivo supone selección de determinados clones</li> </ul>
Xenoinjerto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Son células humanas</li> <li>• Todas las ventajas de los singénicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estroma diferente</li> <li>• Animal con déficit inmunitario</li> <li>• Posible selección clonal si han sido cultivados previamente</li> </ul>

Tabla XVII: Tomado de Frijhoff modificado

En la actualidad se dispone de numerosas líneas celulares de tumores de ratón obtenidas bien desde un tumor establecido espontáneamente o desde tumores inducidos por carcinógenos. Estas líneas celulares pueden ser propagadas in vitro o como tumores subcutáneos. El tejido tumoral o una suspensión de células tumorales, pueden implantarse o ser inyectadas en cualquier sitio ectópico (generalmente subcutáneo) u ortotópicamente en la pared del colon.

Fragmentos de CCR humano pueden ser transplantados directamente en ratones desnudos receptores y servir como modelos experimentales [18, 61, 292, 293]. El inconveniente de usar tejido tumoral intacto es la naturaleza intrínseca heterogénea del material, no solo respecto a distintas zonas del mismo tumor que puede presentar un grado variable de necrosis, sino también cuando se compara con otros tumores. Esto hace que la estandarización y la comparación entre varios experimentos sea muy difícil [18].

### 1.3.- Modelos tumorales ectópicos y ortotópicos

Hay muchos métodos para la implantación de células tumorales humanas o tejido tumoral.

Para muchos, el modelo utilizado, por más fácil y más frecuentemente usado, es el modelo de inyección / implantación subcutánea. La accesibilidad de tumores subcutáneos es una gran ventaja para motorizar la progresión tumoral y para la valoración de los efectos de la intervención terapéutica.

Sin embargo, la microenvoltura subcutánea (ectópica) es diferente a la del colon o el hígado. Interacciones entre la envoltura anfitriona y el tejido del tumor determinan la proliferación de expresión celular tumoral, los niveles de factores de crecimiento y nutrientes, tanto como angiogénesis tumoral y comportamiento metastático. Por ejemplo, el crecimiento de CCR en el colon tuvo riesgo de metástasis, mientras que no lo tuvo en el crecimiento subcutáneo [18, 61, 62, 64].

Alternativamente, el crecimiento tumoral en sitios ortotópicos (por ejemplo el colon, el ciego o pared rectal) pueden ser alcanzados por inyección subserosa de células tumorales o por implantación ortotópica quirúrgica de fragmentos de tumor. Estos fragmentos (habitualmente de 1 mm<sup>3</sup>) pueden ser obtenidos procedentes de una biopsia o a partir de células tumorales de CCR que previamente han sufrido pases en cultivo. El tejido tumoral es suturado a la pared del ciego, el colon o la pared del recto (en el caso de las células en suspensión, el implante en la pared del intestino se hace por inyección). Para el éxito del implante se recomienda dañar el revestimiento seroso de la pared intestinal.

La envoltura del órgano ortotópico o ectópico influye diferentemente en la sensibilidad de las células tumorales por quimioterapia [18]. Por ejemplo, crecimiento de CCR subcutáneamente fueron más susceptibles a doxorubicina que crecimiento de tumores en el ciego de ratones [294].

#### 1.4.- Modelos para formación de metástasis hepáticas

El sitio preferido de formación de metástasis en los pacientes con CCR es el hígado. Dado que un objetivo fundamental en la terapia de cáncer es invariablemente el tratamiento de la enfermedad metastática, es esencial que los modelos en los cuales se forma CCR, desarrollen también metástasis (hígado).

La implantación quirúrgica ortotópica de células de CCR con capacidad metastatizante en ratones desnudos provoca formación inmediata de metástasis en el hígado (100%), nódulos linfáticos y bazo [78, 93-95, 292]. Este modelo es ideal para estudiar muchos aspectos de la formación de metástasis y para analizar la eficacia de nuevos agentes terapéuticos.

También se pueden inducir metástasis hepáticas en el ratón por inyección intraesplénica o inyección directa intraportal de células de CCR. Las células tumorales alcanzan la microcirculación hepática y se detienen en

cualquier sitio por el tamaño o por una retención específica. No obstante la eficiencia de formación de metástasis (hígado) es bajo.

El potencial de metástasis de un crecimiento tumoral dado o de una línea celular, puede ser aumentado por los así llamados “passage cycles”, que consiste en aislar las células de las metástasis hepáticas, expandirlas in vitro y reinyectarlas dentro del bazo o la vena porta. Este procedimiento se repite varias veces. Con cada ciclo de selección el potencial de metástasis de las células aumenta [100]. Pero esto también significa que la población celular ha sido seleccionada y que, en realidad, lo que se ha conseguido es un tumor a expensas de subclones procedentes del tumor original y que por tanto puede tener características diferentes.

Las técnicas anteriores resultan de la colonización del hígado entero con células tumorales únicas. Sin embargo, para algunos tipos de experimentos, se puede requerir crecimientos tumorales en un solo lóbulo hepático o aún como un tumor solitario.

Para obtener crecimiento tumoral en un lóbulo hepático aislado se realiza una inyección subcapsular de suspensión de células tumorales.

La manera más simple de obtener metástasis hepática, es por implantación directa en el hígado de fragmentos tumorales desde tumores preestablecidos. En este procedimiento, se realiza una pequeña incisión en el parénquima hepático, seguida de implantación rápida del fragmento [101].

El mayor inconveniente de los modelos de provocación de metástasis por implantación directa es que sólo permite el estudio de los estadios tardíos de formación de metástasis.

Las metástasis obtenidas por inyección directa de células tumorales dentro de la vena porta o del bazo se aproximan más a la realidad, ya que permiten el estudio de algunos procesos que tienen lugar en los estadios

tempranos, tales como el acceso desde los linfáticos o vasos sanguíneos de las células tumorales al órgano en cuestión.

No obstante, el estudio de los procesos que tienen lugar en las fases tempranas de formación de metástasis espontáneas, requiere que la metástasis tumoral se origine a expensas de un tumor que está creciendo ortotópicamente en el colon. Sin embargo, estos modelos tienen el inconveniente de que son menos eficientes en la provocación de metástasis [44].

#### 1.5- Ventajas, limitaciones y aplicaciones de los modelos de implantación

Las ventajas de los modelos de implantación son el alto grado de predictibilidad y rápida formación del tumor.

En el caso de los tumores subcutáneos, su provocación requiere un mínimo trabajo y su crecimiento es rápido, reproducible y fácilmente objetivable. Por ello, han sido ampliamente utilizados en investigación para probar la efectividad de muchas drogas.

La limitación más importante de estos modelos, es la ineficiente formación de metástasis y el peligro de resultados falsos-positivos obtenidos cuando evaluamos drogas anticáncer [18, 294], posiblemente porque el perfil de expresión de genes de resistencias a multidroga está alterado [295, 296] y porque el microambiente que rodea al tumor ectópico es diferente del ortotópico. Por ello, las drogas que modulan la microenvoltura tumoral no pueden ser evaluadas por modelos ectópicos y deben ser estudiadas en modelos ortotópicos.

Los resultados obtenidos en un modelo de tumor subcutáneo deben siempre ser seguidos por estudios en un modelo de implante ortotópico, preferentemente uno con desarrollo de metástasis [297].

Por otra parte, los compuestos que activan el sistema inmune deben ser probados en ratones inmunocompetentes. Además, esto es necesario para estandarizar protocolos con respecto a la ruta, el método y la dosis de células tumorales inoculadas, tanto como de los agentes terapéuticos.

## **2- Discusión del diseño experimental utilizado**

El modelo elegido por nosotros ha sido la implantación ortotópica de material procedente de CCR esporádico humano.

Como ha quedado señalado, se han tomado muestras de varios tejidos, de ganglios linfáticos regionales y de sangre. No obstante en el presente trabajo sólo consideraremos el tumor original. El análisis de la implantación a distancia será objeto de posteriores estudios.

En estudios previos realizados con animales no inmunodeprimidos comprobamos que el procedimiento simulado (laparotomía y erosión de la serosa de la pared del ciego) estaba exento de mortalidad.

El procedimiento de provocación de tumores en ratones inmunodeprimidos tiene una mortalidad del 30% en el primer implante y del 33% en el segundo.

Esta mortalidad tiene lugar en el periodo postoperatorio inmediato y es atribuible a la dificultad de manejo de estos animales y no al procedimiento quirúrgico en sí. Por ello, y tratando de ahorrar animales, no hemos realizado grupo simulado.

Sacrificado el animal, se ha tomado para el estudio el segmento de la pared del ciego donde se había realizado la implantación. Algunos autores evalúan el tamaño del implante, bien midiendo los diámetros longitudinal y transversal del mismo [298] o mediante fórmulas más o menos complejas [299, 300]. A nosotros nos ha parecido que esos métodos adolecen de subjetividad (es difícil y engañoso determinar macroscópicamente donde empieza el tumor) y no hemos considerado el parámetro del tamaño tumoral.

Los modelos de implantación ortotópica tienen la dificultad de establecer y monitorizar el crecimiento y desarrollo tumoral.

Ninguno de los distintos métodos que se han señalado en el apartado de **Estado Actual de los Modelos Experimentales de CCR** se ha generalizado, porque son caros y poco accesibles. A falta de métodos no invasivos, la única forma, y también la más exacta, de conocer si se ha producido implantación del tumor es la necropsia del animal y su comprobación anatomopatológica tiñendo las piezas con métodos convencionales (Hematosilina-Eosina).

En general, se ha producido una buena correlación entre la visión macroscópica del tumor y los hallazgos histológicos. Sin embargo, en cinco casos (19%) a pesar de que parecía existir en el ciego una tumoración, no se pudo poner de manifiesto histológicamente la presencia de células neoplásicas. Estos animales, como es lógico, fueron retirados del estudio.

La elección del día de sacrificio (aproximadamente 12 semanas), se basó en datos encontrados en la literatura para este modelo [270, 301].

Nuestros porcentajes de implantación (71% en el primer implante y 66% en el segundo) también son mayores que los comunicados por Fu [292] (65%) utilizando fragmentos de tejido tumoral. Flatmark [301], utilizando líneas celulares encuentra que el porcentaje de implantación está en relación con el tipo de línea celular, oscilando entre el 100% y el 40%.

El número de pases no modificaría las tasa de implantación según Thalheimer [302], que encuentra tasas de implantación del 73%, que se mantienen tras nueve pases en el animal.



### **3- Discusión de los datos de IHQ**

Durante el desarrollo y progresión del tumor de colon tienen lugar muchas alteraciones en el material genético. La detección de estas alteraciones y el estudio de su utilidad clínica, es larga y costosa cuando se emplean técnicas de biología molecular [303].

Mediante las técnicas de IHQ, somos capaces de detectar las proteínas anómalas como consecuencia de estas alteraciones genéticas de modo más fácil y rápido, al mismo tiempo que nos permiten entender la relevancia clínica de estas alteraciones.

Los mecanismos reguladores del ciclo celular son un sistema complejo de proteínas que se autorregulan entre sí, al mismo tiempo que regulan el ciclo y las funciones celulares.

El p53 juega un papel central en la regulación del ciclo celular y figura entre las mutaciones más frecuentes encontradas en los tumores. Cuando se relaciona la expresión del p53 con las características clínico-patológicas del tumor, sólo se encontró relación con el grado histológico, indicando que su participación únicamente tienen lugar en los estadios tardíos de la carcinogénesis [303, 304].

El CEA, recibe su nombre porque es posible encontrarlo en el endodermo primitivo y está ausente en la mucosa normal del adulto [165].

El patrón inmunohistoquímico del CEA se mantiene en el tumor implantado con las mismas características que en el tumor original [166].

Los tumores obtenidos por implantación, muestran el mismo patrón de expresión del CEA [305] y del p53 [306, 307].

En nuestro estudio hemos seleccionado la expresión de p53, bax y bcl2 como indicadores de la apoptosis. El p53 interviene en la apoptosis inducida

por bcl2 y bax, aunque los mecanismos íntimos de esta participación no son bien conocidos [303].

El grado de proliferación tumoral medido por la expresión de MIB1 en el primer implante fue similar al del tumor original [305]. En nuestro estudio sin embargo, en el segundo implante los niveles de expresión del MIB1 resultaron menores.

La E-Cadherina tiene un papel fundamental en la regulación de las uniones intercelulares y también participa en la señalización mediada por Wnt [308].

Sasaki [309] ha demostrado que induce supresión del crecimiento y disminución de la invisibilidad de las células tumorales, por lo que se ha propuesto que se trata de un gen supresor tumoral. La proteína es la responsable de la unión entre las células epiteliales y es necesaria para establecer la polaridad celular. Mutaciones de la E-Cadherina están presentes en los tumores con capacidad metastásica [310].

El p16 es un miembro de la familia INK4, un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 9p21 y que se encuentra alterado en un alto porcentaje de tumores humanos [304]. Se ha encontrado que en el CCR tiene lugar la inactivación del mismo [311].

El análisis por IHQ de las proteínas de los genes reparadores, ha demostrado tener la misma sensibilidad y es más fácil y rápido de realizar que la inestabilidad de los microsatélites [312].

Los resultados del análisis del tumor humano muestra que expresa estas proteínas y que, por tanto, no hay alteración de la vía reparadora [313-315]. Los tumores experimentales en cambio, no expresarían ninguna de estas proteínas, con lo que hay que concluir que presentan una alteración en los genes reparadores.

El complejo sistema de los genes reparadores es susceptible de ser alterado en diversas circunstancias. Así Mihaylova [316] demuestra, utilizando cultivos de células de cáncer de mama, que el estrés hipóxico disminuye la expresión de los genes reparadores [317]; en un cultivo de células humanas de leucemia encuentra que niveles no tóxicos de agua oxigenada inactiva los complejos proteicos hMutSalpha, hMutSbeta, y hMulLalfa.

Es decir, que el estrés oxidativo, asociado a la inflamación crónica, dañaría los componentes proteicos de los genes reparadores conduciendo a su inactivación funcional.

Son necesarios estudios a nivel molecular para dilucidar el mecanismo íntimo de esta alteración en nuestro modelo.

#### **4- Discusión de los resultados de la medición del ASO**

Los RLO participan en muchas etapas de la carcinogénesis y progresión tumoral provocando alteraciones en el material genético que han sido sistematizadas por Wiseman [189] en:

1. Alteraciones estructurales en el DNA que van desde mutaciones de pares de bases, reordenamiento de las mismas, deleciones o alteraciones cromosómicas, etc.
2. Modulando la actividad de los genes que regulan la proliferación celular.
3. Afectando la expresión de los mediadores y de las proteínas reguladoras

Por otra parte, es conocida la relación entre inflamación y desarrollo del cáncer. Existen modelos clínicos espontáneos de inflamación crónica que implican mayor predisposición al cáncer como en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, en los que la progresión hacia el cáncer parece ser dependiente de la producción de RLO. Se ha demostrado que en los tejidos neoplásicos coexisten mayores niveles de RLO [191] y menores niveles de antioxidantes celulares [318] .

En general puede decirse, que las lesiones relacionadas con los RLO que no provocan muerte celular, pueden estimular el desarrollo del cáncer [319].

No obstante, es difícil establecer el papel exacto de los RLO en la génesis del cáncer, ya que en todos los sistemas biológicos existen mecanismos de compensación.

Por una parte, una gran actividad tumoral induce la producción de muchos RLO, y un gran estrés oxidativo ha demostrado que puede inducir transformación de las células neoplásicas en cultivos [189]. Pero estímulos persistentes pueden disparar los mecanismos de protección estimulando, por

ejemplo, la activación del p53 e inducir la apoptosis a través de la activación del bcl2 [164, 320].

En modelos experimentales de cáncer por implante de células tumorales se produce un primer pico en relación con los fenómenos inflamatorios subsiguientes a la implantación del material, seguido de un segundo pico en relación con el tamaño tumoral, cuya significación no está clara [175].

En ratas a las que se les ha inducido un tumor con AOM se ha demostrado un mayor nivel de RLO (medidos por quimioluminiscencia de la mucosa) mayor que los controles, que es reversible con superóxido dismutasa (SOD). Esto sugiere que los RLO están implicados en la carcinogénesis inducida por sustancias químicas [191].

Los RLO participarían en los procesos de progresión tumoral y producción de metástasis [321].

La carcinogénesis inducida en ratas puede ser inhibida por la administración de antioxidantes [322-325] y por antiinflamatorios [326], siendo este fenómeno dosis dependiente [327].

Pero al mismo tiempo, otros estudios han demostrado que la depleción de antioxidantes en la dieta de animales a los que se ha inducido un cáncer de cerebro o de mama, provoca un aumento de los niveles de RLO, de la apoptosis y la disminución del número y tamaño de los tumores [198].

Los niveles de ASO se mantienen en niveles similares en nuestros grupos, tanto en el 1<sup>er</sup> como en el 2<sup>o</sup> implante. Es posible que la participación de los RLO en la carcinogénesis y progresión tumoral sea mayor en los tumores inducidos por sustancias químicas, ya que en ellos subyacen fenómenos inflamatorios con la consiguiente mayor producción de RLO.

En los modelos por implantación de material neoplásico los RLO medidos deben corresponder en su mayor parte a los generados por el tejido

tumoral. Esto podría explicar por qué los niveles medidos de RLO se mantienen constantes en nuestro modelo en los sucesivos implantes.

## 5.- Discusión de las Citoquinas y CAMs

Las citoquinas y las CAMs son un grupo muy heterogéneo de sustancias que intervienen en multitud de procesos, entre ellos, el crecimiento y diseminación local y a distancia de las células tumorales.

La expresión de las mismas depende de muchos factores, entre otros, del órgano donde asienta y del tipo de tumor. Por ello su expresión permite, de alguna manera, la caracterización del tumor y el conocimiento de su mecanismo de acción y abre la vía a innumerables opciones terapéuticas.

El TNF es una citoquina que juega un papel central en los procesos de inflamación, lo que constituye la base de su uso en clínica, donde el uso de agentes anti-TNF es ampliamente utilizado en el tratamiento de determinadas enfermedades autoinmunes [328].

El papel del TNF en el proceso de implantación y metastatización tumoral es controvertido. La administración de TNF en determinados modelos experimentales es capaz de favorecer o inhibir la producción de metástasis [328] y la recurrencia tumoral [329]. Larmonier [330] en otro modelo experimental encontró que la provocación de carcinogénesis inducida por implante de células tumorales en animal inmunocompetente, se favorecería por la administración simultánea de Ac-anti TNF.

Zhang [331] demuestra, sin embargo, que el efecto favorable de la radioterapia en el cáncer de pulmón está en relación con los niveles de TNF y su capacidad de inducción de apoptosis.

Se ha descrito una disminución de la respuesta del colon a la acción mantenida del TNF, que podría estar ligado a la disminución de la capacidad de inducir apoptosis [332] o al desarrollo de una cierta resistencia de la mucosa del colon a su acción proinflamatoria [150].

Las citoquinas inflamatorias, liberadas como consecuencia de la inflamación (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF $\gamma$ ), producen un aumento de expresión de la ICAM-1, VCAM y P-Selectina y E-Selectina por las células endoteliales que favorecen la marginación, diapedesis y migración leucocitaria [333].

Existen evidencias de que las células neoplásicas en su proceso de implantación utilizan los mismos mecanismos [334], bien porque la inflamación esté presente en el proceso (caso de la implantación de células desprendidas en la intervención quirúrgica) o en los tumores experimentales provocados por implantación [335] o porque las células tumorales sean capaces per se de expresar las mismas moléculas [336].

En el caso de los tumores experimentales provocados por implantación de material tumoral, las primeras fases tras la implantación de las células tumorales, el crecimiento y anidación de las mismas depende del establecimiento de una neovascularización [337], fenómeno mediado por la expresión de TNF y de CAMs [338] y que seguramente también depende, en algún grado, del órgano implicado [339]. La inyección intraesplénica de células cancerosas singénicas en el ratón induce un aumento en la expresión de TNF que va en relación con la capacidad de anidación de las mismas [340].

La estimulación de la producción de CAMs mediada por el TNF, es tiempo y dosis dependiente [341, 342] y pondrían en marcha fenómenos de marginación, adherencia, migración y extravasación leucocitaria. La P-Selectina inducida por el TNF favorece la adherencia de las células neoplásicas con el endotelio y las plaquetas [164]. La unión de la P-Selectina a los grupos sulfátido de las células tumorales, tiene un efecto favorecedor de la producción de metástasis [343].

El bloqueo de la expresión de P-Selectina con antitrombina [344] o determinadas heparinas [164], tienen un efecto protector frente a la producción de metástasis bloqueando la producción de P-Selectina a través de la inactivación de los grupos sulfátido de las células tumorales [343], lo que abre



una interesante vía de estudio, ya que el uso de heparina podría tener utilidad clínica para disminuir la incidencia de metástasis en el postoperatorio.

En el presente trabajo, hemos utilizado el análisis de la expresión de TNF y de las CAMs para la caracterización tumoral. De nuestros resultados, se deduce que el tumor mantiene prácticamente el mismo perfil respecto al tumor original y en los sucesivos implantes.

Llama la atención el hecho de que los niveles de ICAM se eleven en los tumores tras el segundo implante. La ICAM es una molécula de adhesión intercelular cuya función primaria más conocida, es favorecer la unión de los leucocitos al endotelio, iniciándose así los fenómenos de migración leucocitaria. Estudios in vitro han demostrado que se expresa en las células endoteliales y en las epiteliales, indicando que debe tener más funciones. Aunque inicialmente se cree que su expresión está mediada por el TNF y por otras citoquinas proinflamatorias, los mecanismos de su expresión in vivo no son bien conocidos [345].

El hecho de que este aumento persista con niveles de TNF indicaría que su inducción se produce por otros mecanismos, como ha sugerido Vainer [150]. La significación y el mecanismo de inducción de este aumento necesitan otros estudios.

## **VIII. CONCLUSIONES**

1. La utilización de modelos animales en el estudio de cáncer es hoy por hoy insustituible.
2. No existe ningún modelo ideal. La elección del modelo experimental viene condicionada en función del aspecto que se pretende estudiar.
3. El modelo estudiado por nosotros (implante ortotópico de un fragmento tumoral humano en animal inmunodeprimido) es fácil de realizar técnicamente, reproducible y con una alta tasa de implantación en el animal.
4. La arquitectura y características del tumor se mantienen durante los sucesivos pases en el animal.
5. Los tumores obtenidos expresan las mismas CAMs y marcadores tumorales, lo que permite predecir un comportamiento análogo al tumor humano del que proceden.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

1. Arnaud JP; Schoegel M; Ollier JC; Adloff M, *Colorectal Cancer in patient over 80 years of age*. Dis Colon Rectum. Vol. 34. 1991. 896-898.
2. McGregor JR; Galloway DJ; MxColloch; George WD, *Anastomotic suture materials and implantation metastasis: an experimental study*. Br J Surg. Vol. 76. 1989. 331-334.
3. Midgeley R; Kerr D, *Colorectal cancer*. Lancet. Vol. 353. 1999. 391-399.
4. Kinlezw KW; Vogelstein B, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell. Vol. 87. 1996. 159-170.
5. García JC; Cugat E; Angás J; González FJ; Reverter JC; Lacy AM, *Cáncer colorrectal: resultados de un protocolo de seguimiento*. Cir Esp. Vol. 53. 1993. 430-433.
6. Tissot E; Naouri A; Nasr JR; Feghali B, *Récidives locorégionales isolées des cancers coliques: résultats du traitement, facteurs de risque de ces récurrences*. Lyon Chir. Vol. 88. 1992. 277-279.
7. Lorenz E; Stewart HL, *Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 2-O-methylcholanthrene*. J Natl Cancer Inst. Vol. 1. 1941. 17-40.
8. Bibby MC; Conors T, *Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages*. Eur J Cancer. Vol. 40. 2004. 852-857.
9. Guda K; Upender MB; Belinsky G; Flynn C; Nakanishi M; Marino JN; Ried T; Rosenberg DW, *Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability*. Oncogene. Vol. 23. 2004. 3813-3821.
10. Corpet DE; Pierre F, *Point: from animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Vol. 12. 2003. 391-400.

11. Hann B; Balmain A, *Curr Opin Building 'validated' mouse models of human cancer*. Cell Biol. Vol. 13. 2001. 778-784.
12. Rosenberg MP; Bortner D, *Why transgenic and knockout animal models should be used (for drug efficacy studies in cancer)*. Cancer Metast Rev. Vol. 17. 1998. 295-299.
13. Frijhoff AFW; Conti CJ; Senderowicz AM, *Advances in molecular carcinogenesis: current and future use of mouse models screen and validate molecularly targeted anticancer drugs*. Mol Carcinog. Vol. 39. 2004. 183-194.
14. Heijstek MW; Kranenburg O; Borel Rinkes IHM, *Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases*. Dig Surg. Vol. 22. 2005. 16-25.
15. Berwald Y; Sachs L, *In vitro cell transformation with chemical carcinogens*. Nature. Vol. 200. 1963. 1182-4.
16. Flatmar kK; et al, *Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice*. Eur J Cancer, 2004. **40**(10): p. 1593-1598.
17. Tomita H; Marcelo P; Wilson JW; Gramlich TL; Fabio VW, *CO2 pneumoperitoneum does not enhance tumor growth and metastases*. Dis colon Rectum. Vol. 44. 2001. 1297-1301.
18. Pocard M; Isukui H; Salmon RJ; Dutrillaux B; Poupon MF, *Efficiency of orthotopic xenograft models for human colon cancers*. In Vivo. Vol. 10. 1996. 463-469.
19. Shawler DL; Dorigo O; Gjerset RA; Royston I; Sobol RE; Fakhrai H, *Comparison of gene therapy with interleukin-2 gene modified fibroblasts and tumor cells in the murine CT-26 model of colorectal carcinoma*. J Immunother. Vol. 17. 1995. 201-208.
20. Anisimov VN; Zabezhinski MA; Rossolini G; Zaia A; Piantanelli A; Basso A; Piantanelli L, *Long-live euthymic BALB/c-nu mice. II. Spontaneous tumors and other pathologies*. Mech Age Dev. Vol. 122. 2001. 477-489.
21. Chandra M; Frith CH, *Spontaneous neoplasms in aged CD-1 mice*. Toxicol Lett. Vol. 61. 1992. 67-74.
22. Bankert RB; Egilmez NK; Hess SD, *Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies*. Trends Immunol. Vol. 22. 2001. 386-393.
23. Koaek-Larsen M; Thorup I; Diederichsen A; Fenger C; Hoitinga MR, *Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: Comparative aspects with those in humans*. Comp Med. Vol. 50. 2000. 16-26.
24. Yang J; shikata N; Mizouka H; Tsubura A, *Colon carcinogenesis in shrews by intrarctal infusion of N-methyl-N-nitrosourea*. Cancer Lett. Vol. 110. 1996. 105-112.
25. Rogers KJ; Pegg AE, *Formation of O6-methylguanine by alkylation of rat liver, colon and kidney DNA following administration of 1,2-dimethylhydrazine*. Cancer Res. Vol. 37. 1977. 4082-4087.
26. Kanagalingam K; Balis EM, *In vivo repair of rat intestinal DNA damage by alkylating agents*. Cancer. Vol. 36. 1975. 2364-2372.
27. Tutton PJ; Barkla DH, *The influence of adrenoceptor activity on cell proliferation in colonic crypt epithelium and in colonic adenocarcinoma*. Virchows Arch Zell Pathol, 1977. **24**: p. 139-64.
28. Tutton PJ; Barkla DH, *Cytotoxicity of 5,6-dihidroxytryptamine in dimethylhydrazine-induced carcinomas of rat colon*. Cancer Res, 1977. **37**: p. 1241-4.

29. Ward JM; Yamamoto RS, B.C., *Pathology of intestinal neoplasms and other lesions in rats exposed to azoxymethane*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**: p. 1029-39.
30. Guda K; et al, *Carcinogen-induced colon tumors in a mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability*. Oncogene, 2004. **23**(21): p. 3813-3821.
31. Corpet DE; Pierre F, *How good are rodents models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans?. A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men*. Eur J Cancer. Vol. 41. 2005. 1911-1922.
32. Oscarson JE; Veen VF; Ross JS; Malt RA, *Dimethylhydrazine induced colonic neoplasia: dissociation from endogenous gastrin levels*. Surgery. Vol. 91. 1982. 525-530.
33. Robert Bruce R, *From animal models to prevention of colon cancer .Criteria for proceeding from preclinical studies and choice of models for prevention studies*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. Vol. 12. 2003. 401-404.
34. Haase P; Cowen DM; Knowles JC; Cooper EH, *Evaluation of dimethylhydrazine induced tumours in mice as a model system for colorectal cancer*. Br J Cancer. Vol. 28. 1973. 530-543.
35. Cook JW; Kennaway EL; Kennaway NM, *Production of tumors in mice by deoxycholic acid*. Nature. Vol. 145. 1940. 627.
36. Lacassagne A; Buu-Hoi NP; Zaidela F, *Carcinogenic activity of apocholic acid*. Nature. Vol. 190. 1961. 1007-1008.
37. Narisawa T; Magadia NE; Weisburger JH; Wynder EL, *Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal installation of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in rats*. J Natl Cancer Inst. Vol. 53. 1974. 1093-1097.
38. Redd BS; Narasawa T; Weisburger JH; Wynder EL, *Promoting effect of sodium deoxycholate on colon adenocarcinomas in germ-free rats*. J Natl Cancer Inst. Vol. 56. 1976. 441-442.
39. Redd BS; Watanabe K; Weisburger JH; Wynder EL, *Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats*. Cancer Res. Vol. 37. 1977. 3238-3242.
40. Viñas Salas J; Piñol Felis C; Fermiñán A; Egido R; Pérez-Holanda S; Biendicho P; Buenestado J; Reñé Espinet J, *Traumatismos repetitivos sobre la mucosa promueven cáncer de colon en un modelo experimental en ratas*. Rev Esp Enferm Dig. Vol. 93. 2001. 140-143.
41. Garmaise AB; Rogers AE; Sarvaris CA; Zamcheck N; Newberne PM, *Immunologic aspects of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats*. J Natl Cancer Inst. Vol. 54. 1975.
42. Steele G Jr; Sjogren HO; Rosengren JE; Lindstrom C; Larsson A; Leandroer L, *Sequential studies of serum blocking activity in rats bearing chemically induced primary bowel tumors*. J Natl Cancer Inst. Vol. 54. 1975. 959-967.
43. O'Donnell AF; O'Connell PR; Royston D; Johnston DH; Barnard R; Bouchier-Hayes D, *Suture technique affects perianastomotic colonic crypt cell production and tumour formation*. Br J Surg. Vol. 78. 1991. 671-674.
44. Matsuda I; Konno H; Tanaka T; Nakamura S, *Antimetastatic effect of hepatotropic liposomal adriamycin on human metastatic liver tumors*. Surg Today. Vol. 31. 2001. 414-420.

45. Takahashi T; Morotomi M; and Nomoto K, *A novel model of rectal cancer established by orthotopic implantation of colon cancer cells*. *Cancer Sci*. Vol. 95. 2004. 514-519.
46. Byrne PJ; Stephens RB; West B; O'Regan M; Hennessy TP, *Handling of the bowel during surgery promotes tumour formation in an experimental model*. *Br J Surg*. Vol. 75. 1988. 612.
47. Navarrete A; Spjut H, *Effect of colostomy on experimentally produced neoplasms of the colon of the rat*. *Lancet*. Vol. 2. 1967. 1466-1472.
48. Zham J; Lam LK, *Colonoscopic colostomy model for colon tumorigenesis studies in rats*. *Carcinogenesis*. Vol. 15. 1994. 1571-1576.
49. Kanazawa K; Yamamoto T; Sato S, *Experimental induction of colonic carcinomas in rats*. *Jpn J Exp Med*. Vol. 45. 1975. 439-456.
50. Gennaro AR; Villanueva R; Sukonthaman Y; Vathanophas V; Rosemond GP, *Chemical carcinogenesis in transposed intestinal segments*. *Cancer Res*, 1973. **33**: p. 536-41.
51. Phillips RK; Cook HT, *Effect of steel wire sutures on the incidence of chemically induced rodent colonic tumours*. *Br J Surg*. Vol. 73. 1986. 671-674.
52. Ross AH; Smith MA; Anderson JR; Smail WP, *Late mortality after surgery for peptic ulcer*. *N Engl J Med*. Vol. 307. 1982. 519-522.
53. Houghton PW; Owen RJ; Henly PJ; Mortensen NJ; Hill MJ; Williamson RC, *Experimental colonic carcinogenesis after gastric surgery*. *Br J Surg*. Vol. 77. 1990. 774-8.
54. Williamson RC; Davies PW; Bristol JB; Wells M, *Intestinal adaptation and experimental carcinogenesis after partial colectomy*. *Gut*. Vol. 23. 1982. 316-325.
55. Rainey JB; Davies PW; Williamson RC, *Relative effects of ileal resection and bypass on intestinal adaptation and carcinogenesis*. *Br J Surg*. Vol. 71. 1984. 197-202.
56. Rainey JB; Maeda M; Williams C; Williamson RC, *The carcinogenic effect of intrathecal deoxycholate is reduced by oral metronidazole*. *Br J Cancer*. Vol. 49. 1984. 631-636.
57. Bristol JB; Wells M; Williamson RC, *Adaptation to jejunioileal bypass promotes experimental colorectal carcinogenesis*. *Br J Surg*, 1984. **71**(123-6).
58. Winsett OE; Townsend CM; Glass EJ; Thompson JC, *Gastrin stimulates growth of colon cancer*. *Surgery*. Vol. 99. 1986. 302-307.
59. Harte PJ; Steele G; Rayner AA; Munroe AE; King VP; Wilson RE, *Effects of major small bowel resection on dimethyl hydrazine induced bowel carcinogenesis*. *J Surg Oncol*. Vol. 18. 1981. 87-93.
60. Williamson RC; Rainey JB, *The relationship between intestinal hyperplasia and carcinogenesis*. *Scand J Gastroenterol*. Vol. 19. 1984. 57-76.
61. Fu X; Herrera H; Kubota T; Hoffman RM, *Extensive liver metastasis from human colon cancer in nude and scid mice after orthotopic onplantation of histologically-intact human colon carcinoma tissue*. *Anticancer Res*. Vol. 12. 1992. 1395-1397.
62. Bresalier RS; Raper SE; Hujanen ES; Kim YS, *A new animal model for human colon cancer metastasis*. *Int J Cancer*. Vol. 39. 1987. 625-630.
63. Giavazzi R; Campbell DE; Jessup JM; Cleary K; Fidler IJ, *Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice*. *Cancer Res*. Vol. 46. 1986. 1928-1933.



64. Kubota T, *Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: The importance of orthotopic transplantation*. J Cell Biol Chem. Vol. 56. 1994. 4-8.
65. Fu XY; Besterman JM; Monosov A; Hoffman RM, *Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**: p. 9345-9349.
66. Davies G; Duke AG; Kelly SA; Hermonn-Taylor J, *Growth of human digestive tumor xenografts in athymic nude rats*. Br J Cancer. Vol. 43. 1981. 53-58.
67. Tsukui H; Pocard M; Salmon RJ; Lefrancois D; Languiville-Mimoune O; Dutrilleaux B; Poupon M F, *Implantation orthotopique de cancers humains du colon sur souris nude. Methodologie et interet physiopatologique*. Gastroenterol Clin Biol. Vol. 18. 1994. 112-118.
68. Luongo C; Gould KA; Su LK; et al, *Mapping of multiple intestinal neoplasia (Min) to proximal chromosome 18 of the mouse*. Genomics. Vol. 15. 1993. 3-8.
69. Kim SH; Roth KA; Moser AR; Gordon JI, *Transgenic mouse models that explore the multistep hypothesis of intestinal neoplasia*. J Cell Biol. Vol. 123. 1993. 877-893.
70. Morin PJ; Vogelstein; Kinzler KW, *Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 93. 1996. 7950-7954.
71. Moser AR; Mattes EM; Dove WF; Lindstrom MJ; Haag JD; Gould MN, *ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 8977-8981.
72. Leclerc D; et al, *APC Min/+ mouse model of colon cancer :Gene expression profiling in tumors*. J Cell Biol Chem. Vol. 93. 2004. 1242-1254.
73. Oshima M; Oshima H; Kitagawa K; Kobayashi M; Itakura C; Taketo M, *Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 92. 1995. 4482-4486.
74. Fodde R; Edelmann W; Yang K; et al, *A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 91. 1994. 8969-8973.
75. Smits R; Kartheuser A; Jagmohan-Changur S; et al, *Loss and the entire chromosome 18 but absence of mutations at the Ras and Tp53 genes in intestinal tumors from Apc1638N, a mouse model for Apcdriven carcinogenesis*. Carcinog. Vol. 18. 1997. 321-327.
76. Miggley CA; White S; Howitt R; et al, *APC expression in normal human tissues*. Pathol. Vol. 181. 1993. 426-433.
77. Colnot S; et al, *Colorectal cancers in a new mouse model of FAP: influence of genetic and environmental modifiers*. lab Invest. Vol. 84. 2004. 1619-1630.
78. Arango D; Corner GA; Wadler S; Catalano PJ; Augenlichts LH, *c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo*. Cancer Res. Vol. 61. 2001. 4910-4915.
79. D'Andrea GM; Seidman AD, *Docetaxel and paclitaxel in breast cancer therapy: Present status and future prospects*. Semin Oncol. Vol. 24. 1997. S13-S27 to S13-S44.
80. Pfeifer A; Brandon EP; Kootstra N; Gage FH; Verma IM, *Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: Efficient gene targeting in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 98. 2001. 11450-11455.

81. Vooijs M; Jonkers J; Berns A, *A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent*. EMBO Rep. Vol. 2. 2001. 292-297.
82. Jackson EL; Willis N; Mercer K; et al, *Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras*. Genes Dev. Vol. 15. 2001. 3243-3248.
83. Tuveson DA; Jacks T, *Technologically advanced cancer modeling in mice*. Curr Opin Genet Dev. Vol. 12. 2002. 105-110.
84. Jackson-Grusby L, *Modeling cancer in mice*. Oncogene. Vol. 21. 2002. 5504-5514.
85. Silver DP; Livingston DM, *Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity*. Mol Cell. Vol. 8. 2001. 233-243.
86. Abdulkadir SA; Magee JA; Peters TJ; et al, *Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia*. Mol Cell Biol. Vol. 22. 2002. 1495-1503.
87. de Wind N; Dekker M; van Rossum A; van der Valk M; te Riele H, *Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Cancer Res. Vol. 58. 1998. 248-255.
88. Edelmann W; Yang K; Kuraguchi M; Heyer J; Lia M; Kneitz B; Fan K; Brown A.M; Lipkin M; Kucherlapati R, *Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice*. Cancer Res. Vol. 59. 1999. 1301-1307.
89. Prolla T.A; Baker S.M; Harris A.C; Tsao J.L; Yao X; Bronner C.E; Zheng B; Gordon M; Reneker J; et al, *Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair*. Nat Genet, 1998. **18**: p. 276-279.
90. Reitmair AH; Redston M; Cai JC; Chuang TC; Bjercknes M; Cheng H; Hay K; Gallinger S; Bapat B; Mak TW, *Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice*. Cancer Res. Vol. 56. 1996. 3842-3849.
91. de Wind N; Dekker M; Berns A; Radman M; te Riele H, *Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer*. Cell. Vol. 82. 1995. 321-330.
92. García-Olmo D; García-Rivas M; Garcia-Olmo D; Ontañón J, *The site of injection of tumor cells in rats does not influence the subsequent distribution of metastases*. Oncology Reports. Vol. 10. 2003. 903-907.
93. Fukurawa T; Kubota T; Watanabe M; Kuo TH; Nishibori H; Kase S; Saikawa Y; Tanino H; Teramoto T; Ishibiki K, *A metastatic model of human colon cancer constructed using ecal implantation of cancer tissue in nude mice*. Sur Today, 1993. **23**: p. 420-423.
94. Rashidi B; Sun FX; Jiang P; An Z; Gamagami R; Moossa AR; Hoffman RM, *A nude mouse model of massive liver and lymph node metastasis of human colon cancer*. Anticancer Res. Vol. 20. 2000. 715-722.
95. Sun FX; Sasson AR; Jiang P; An Z; Gamagami R; Li L; Moossa AR; Hoffman RM, *An ultrametastatic model of human colon cancer in nude mice*. Clin Exp Metastasis. Vol. 17. 1999. 41-48.
96. Zong L; et al, *Xenograft models for liver metastases: relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction*. Mol Ther. Vol. 9. 2004. 650-657.

97. Mayhew E.G; Goldrosen M.H; Vaage J; Rustum YM, *Effects of liposome entrapped doxorubicin on liver metastases of mouse colon carcinomas 26 and 38*. J Natl Cancer Inst. Vol. 78. 1987. 707-713.
98. Weese JL; Emoto SE; Sondel PM, *Reduced incidence of hepatic metastases by perioperative treatment with recombinant human interleukin-2*. Dis Colon Rectum. Vol. 30. 1987. 503-507.
99. Liu DL; Randall M; Svanberg K; Sefert J, *Immunotherapy in liver tumours. III. A new experimental model of metastatic liver tumours from colorectal carcinoma for cytokine therapy*. Cancer Lett. Vol. 88. 1995. 211-219.
100. Morikawa K; Walker SM; Jessup JM; Fidler IJ, *In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice*. Cancer Res. Vol. 48. 1988. 1943-1948.
101. Nyati MK; Symon Z; Kievit F; Dornfeld KJ; Rynkiewicz SD; Ross BD; Rehemtulla A; Lawrence TS, *The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model*. Gene Ther. Vol. 9. 2002. 844-849.
102. Noguera Aguilar JF; Amengual Antich I; Plaza Martínez A; Tortajada Collado C; Morón Canis JM; Pujol Tugores JJ, *Influencia de la manipulación quirúrgica del colon en la carcinogénesis cólica inducida en ratas*. Revista Española de Enfermedades Digestivas. Vol. 96. 2004. 327-330.
103. Resor L; Bowen TJ; Wynshaw-Boris A, *Unraveling human cancer in the mouse: Recent refinements to modeling and analysis*. Hum Mol Genet. Vol. 10. 2001. 669-675.
104. Haier J; et al, *An intravital model to monitor steps of metastatic tumor cell adhesion within the hepatic microcirculation*. J Gastrointest Surg. Vol. 7. 2003. 507-515.
105. Lewis JS; Achilefu S; Garbow JR; Laforest R; Welch M.J, *Small animal imaging. Current technology and perspectives for oncological imaging*. Eur J Cancer. Vol. 38. 2002. 2173-2188.
106. Weissleder R, *Scaling down imaging: Molecular mapping of cancer in mice*. Nat Rev Cancer. Vol. 2. 2002. 11-18.
107. Chishima T; Miyagi Y; Wang X; Yamaoka H; Shimada H; Moossa AR; Hoffman RM, *Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression*. Cancer Res. Vol. 57. 1997. 2042-2047.
108. Hoffman RM, *Orthotopic transplant mouse models with green fluorescent protein expressing cancer cells to visualize metastasis and angiogenesis*. Cancer Metast Rev. Vol. 17. 1998. 271-277.
109. Yang M; Baranov E; Jiang P; Sun FX; Li XM; Li L; Hasegawa S; Bouvet M; Al Tuwaijri M; Chishima T; et al, *Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastasis*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 97. 2000. 1206-1211.
110. Meuwissen R; Jonkers J; Berns A, *Mouse models for sporadic cancer*. Exp Cell Res. Vol. 264. 2001. 100-110.
111. Johnson J; Decker S; and Zaharevitz D, *Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials*. Brit J Cancer. Vol. 84. 2001. 1424-1431.
112. Cowen SE; Bibby MC; Double JA, *Characterisation of the vasculature within a murine adenocarcinoma growing in different sites to evaluate the potential of vascular therapies*. Acta Oncol. Vol. 34. 1995. 357-360.

113. Burger AM; Double JA; Konopa J; Bibby MC, *Preclinical evaluation of novel imidazoacridinone derivatives with potent activity against experimental colorectal cancer*. Br J Cancer. Vol. 74. 1996. 1369-1374.
114. Moser AR; Dove WF; Roth KA; Gordon JI, *The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system*. J Cell Biol. Vol. 116. 1992. 1517-1526.
115. Cunningham JM; et al, *Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability*. Cancer Res. Vol. 58. 1998. 3455-3460.
116. Umar A; et al, *Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. J Natl Cancer Inst. Vol. 96. 2004. 261-268.
117. Ribic CM; et al, *Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer*. N Engl J Med. Vol. 349. 2003. 247-257.
118. Tomlinson L; Ilyas M; Johnson V; et al, *A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer*. J Pathol. Vol. 184. 1998. 148-152.
119. Sheaff MT; Berry CL, *Colorectal carcinoma: where are we now?. Recent Advances in Histopathology 19*. Ed. Churchill Livingstone. Vol. 19. 2001. 227-241.
120. Schena M; Shalon D; Davis RW; Brown PO, *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**: p. 467-470.
121. Zhang L; Zhou W; Velculescu VE; Kern SE; Hruban RH; Hamilton SR; Vogelstein B; Kinzler KW, *Gene expression profiles in normal and cancer cells*. Science. Vol. 276. 1997. 1268-1272.
122. Perou CM; Sorlie T; Eisen MB; van de RM; Jeffrey SS; Rees CA; et al, *Molecular portraits of human breast tumors*. Nature. Vol. 406. 2000. 747-752.
123. Bittner M; Meltzer P; Chen Y; Jiang Y; Seftor E; Hendrix M; et al, *Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling*. Nature. Vol. 406. 2000. 536-540.
124. Chung CH; Parker JS; Karaca G; Wu J; Funkhouser WK; Moore D; et al, *Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression*. Cancer Cell. Vol. 5. 2004. 489-500.
125. Albelda SM; Smith W; and Ward PA, *Adhesion molecules and inflammatory injury*. FASEB J. Vol. 8. 1994. 504-512.
126. Hoog N; Clive Landis R, *Adhesion molecules in cell interactions*. Curr Opin Immunol. Vol. 5. 1993. 383-390.
127. Menger MD; Vollmar B, *Adhesion molecules as determinants of disease: from molecularbiology to surgical research*. Br J Surg. Vol. 83. 1996. 588-601.
128. Carlos TM; Harlan JM, *Leukocyte-Endothelial adhesion molecules*. Blood. Vol. 84. 1994. 2068-2101.
129. Chothia C; Jones EY, *The molecular structure of cell adhesion molecules*. Annu Rev Biochem. Vol. 66. 1997. 823-862.
130. Collins TL; Kassner PD; Bierer BE; Burakoff SJ, *Adhesion receptors in lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol. Vol. 6. 1994. 385-393.
131. Hynes RO, *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell. Vol. 69. 1992. 11-25.
132. Springer TA, *Adhesion receptor of the immune system*. Nature (Lond). Vol. 346. 1990. 425-433.

133. Cid i Xutglà MC; et al, *Moléculas de adhesión en las interacciones entre los leucocitos, el endotelio y la matriz extracelular (I). Estructura, distribución y función biológica.* Medicina Clínica. Vol. 108. 1997. 472-477.
134. Sánchez Sánchez L; Hernández Vázquez JMV; López Marure R, *Papel de las cadherinas en la metástasis.* REB. Vol. 24. 2005. 97-103.
135. Takeichi M, *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.* Annu Rev Biochem. Vol. 59. 1990. 237-252.
136. Takeichi M, *Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis.* curr Opin Cell Biol. Vol. 5. 1993. 806-811.
137. Birchmeier W; Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.* Biochim Biophys Acta. Vol. 1198. 1994. 11-26.
138. Jawhari A; Farthing M; Pigmatelli M, *The importance of the E-cadherin-catenin complex in the maintenance of intestinal epithelial homeostasis: more than intercellular glue.* Gut. Vol. 41. 1997. 581-584.
139. Okegawa T; Li Y; Pong RC; Hsieh JT, *Cell adhesion proteins as tumor suppressors.* J Urol. Vol. 167. 2002. 1836-1843.
140. Oka H; Shiozaki H; et al, *Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis.* Cancer Res. Vol. 53. 1993. 1696-1701.
141. Joo YE; Park CS; Kim HS; Choi SK; Rew JS; KimSJ, *Prognostic significance of E-cadherin/catenin complex expression in gastric cancer.* J Korean Med Sci. Vol. 15. 2000. 655-666.
142. Ghadimi BM; Behrens ; Hoffmann I; Haensch W; Birchmeier W; Schlag PM, *Immunohistological analysis of E-cadherin. alpha-. beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling.* Eur J Cancer. Vol. 35. 1999. 60-65.
143. Cubo T; Padilla D; Ortega G; Ramia JM; Pardo R; Martín J; López A; Hernández Calvo J, *Biología molecular del proceso metastásico del cáncer colorrectal.* Cir Esp. Vol. 68. 2000. 577-587.
144. Berndorff D; Gessner R; Kreft B; et al, *Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca (2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine.* J Cell Biol. Vol. 125. 1994. 1353-1369.
145. Kwak JM; et al, *The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer.* Dis Colon Rectum. Vol. 50. 2007. 1873-1880.
146. Farhood A; McGuire GM; Manning AM; et al, *Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver.* J Leukoc Biol. Vol. 57. 1995.
147. Hession C; Tizard R; Vassallo C; et al, *Cloning of an alternate form of vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1).* J Bio Chem. Vol. 266. 1991. 6682.
148. Lobb R; Chi-Rosso G; Leone D; et al, *Expression and functional characterization of a soluble form of vascular cell adhesion molecule 1.* Biochem Biophys Res Comm. Vol. 78. 1991. 1498-1504.
149. Moore CM; Ehlayed M; Leiva LE; Sorensen RU, *New concepts in the immunology of sickle cell disease.* Ann Allergy Asth Immunol. Vol. 76. 1996. 385-403.

150. Vainer B; Sorensen S; Seidelin J; Nielsen OH; Horn T, *Expression of ICAM-1 in colon epithelial cells: an ultrastructural study performed on in vivo and in vitro models*. Virchows Arch. Vol. 443. 2003. 774-781.
151. Vainer B; Horn T; Nielsen OH, *Colonic epithelial cell expression of ICAM-1 relates to loss of surface continuity: a comparative study of inflammatory bowel disease and colonic neoplasms*. Scand J Gastroenterol. Vol. 41. 2006. 318-325.
152. Caro-Paton A G, *Interleucinas y cancer de colon ( Edit )*. REv Esp Enferm Dig ( Madrid), 2005. **97**(9613-618).
153. Hynes RO, *Integrins: A family of cell susface receptors*. Cell. Vol. 48. 1987. 549.
154. Horwitz AF, *Integrins and Health*. Scientifican American. Vol. May. 1997. 46-53.
155. Eliceiri BP; Cheresh DA, *The role of alpha v integrins during an giogenesis*. Mod Mde. Vol. 4. 1998. 741-750.
156. Gasparini G, *The ratinale and future potencial of angiogenesis inhibitors in neoplasia*. Drugs. Vol. 58. 1999. 17-38.
157. Lasky LA, *Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. Science. Vol. 258. 1992. 964-969.
158. Lefer AM; Weyrich AS; Buerke M, *Role of selectins, a new fmily of molecules, in ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasclar Research. Vol. 28. 1994. 289-294.
159. McEver RP, *Selectins: Novel Receptors that Mediate Leukocyte Adhesion During Inflammation*. Thromb Haemost. Vol. 65. 1991. 223-228.
160. Mannori G; Crottet P; Cecconi O; et al, *Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins*. Cancer Res. Vol. 55. 1995. 4425-4531.
161. Bevilacqua MP; Nelson RM, *Selectins*. J Clin Invest. Vol. 91. 1992.
162. Wittig BM; Kaulen H; Thees R; Schitt C; Knolle P; Stock J; et al, *Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer*. Eur J Cancer, 1996. **32**: p. 1215-1218.
163. Brodt P; Fallavollita L; Bresalier RS; Meterissian S; Norton CR; Woltzky BA, *Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis*. Int J Cancer. Vol. 71. 1997. 612-619.
164. Wei M; Tai G; Gao Y; Li N; Huang B; Zhou Y; Hao S; Zeng X, *Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions*. J Bio Chem. Vol. 279. 2004. 29202-29210.
165. Pokorny RM; Hunt LE; Galandiuk S, *What's new with tumor markers for colorectal cancer*. Dig Surg. Vol. 17. 2000. 209-215.
166. Lewis JC; Smith PA; Keep PA; Boxer GM, *A comparison of the content and immunohistochemical patterns of CEA-like activity in human colorectal tumors and nude mouse xenografts*. Exp Pathol. Vol. 24. 1983. 227-235.
167. Jessup JM; Ishii S; Mitzoi T; Edmiston KH; Shiji Y, *Carcinoembryonic antigen facilitates experimental metastasis through a mechanisms that does not involve adhesion to liver cells*. Clin Exp Metastasis. Vol. 17. 1999. 481-488.
168. Minami S; Furui J; Kanematsu T, *Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen*. Cancer Res. Vol. 61. 2001. 2732-2735.
169. Ruibal Morell A, *Marcadores tumorales de secreción: situación actual*. Med Clin. Vol. 118. 2002. 750-756.

170. Abel ME; Rosen L; Kodner IJ; Fleshman JW; Hicks T; Kennedy HI; et al, *Task Force, American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for the treatment of rectal carcinoma. Supporting documentation.* Dis Colon Rectum. Vol. 36. 1993. 991-1006.
171. Slentz K; Senagore A; Hibbert J; Mazier WP; Talbott TM, *Can preoperative and postoperative CEA predict survival after colon cancer resection?* Am Surg. Vol. 60. 1994. 528-532.
172. Northover J, *Carcinoembryonic antigen and recurrent colorectal cancer.* Gut. Vol. 27. 1986. 117-122.
173. Louhimo J; Carpelan-Holmström M; Alftan H; Stenman U-H; Jarvinen HJ; Haglund C, *Serum HCGB, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer.* Int J Cancer. Vol. 101. 2002. 545-548.
174. Reiter W; Stieber P; Reuter C; Nagel D; Lau-Werner U; Pahl H; Fateh-Moghadam A, *Preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 and their prognostic significance in colorectal carcinoma.* Anticancer Res. Vol. 17. 1997. 2935-2938.
175. Bruzzo J; Chiarella P; Fernández G; Bustuoabad OD; Ruggiero RA, *Cáncer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino.* Medicina (B. Aires). Vol. 67. 2007. 469-474.
176. Muller AJ; Scherle P, *Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecules inhibitors.* Nature Rev. Vol. 6. 2006. 611-625.
177. Le NT; Xue M; Castelnoble LA; Jackson CJ, *The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation.* Front Biosci. Vol. 12. 2007. 1475-1487.
178. ten Kate M; Hofland LJ; van Grevenstein WM; van Koetsveld PV; Jeekel J; van Eijck CH, *Influence of proinflammatory cytokines on the adhesion of human colon carcinoma cells to lung microvascular endothelium.* Int J Cancer, 2004. **112**: p. 943-950.
179. Thomas P; Hayashi H; Zimmer R; Forse RA, *Regulation of cytokine production in carcinoembryonic antigen stimulated kupffer cells by beta-2-adrenergic receptors: implications for hepatic metastases.* Cancer Lett. Vol. 209. 2004. 251-257.
180. Waterston AM; Salway F; Andreakos E; Butler DM; Feldmann M; Coombes RC, *TNF autovaccination induces self anti-TNF antibodies and inhibits metastasis in a murine melanoma model.* British Journal of Cancer. Vol. 90. 2004. 1279-1284.
181. Alves A; Vibert E; Trajcevski S; Solly S; Fabre M; Soubrane O; et al, *Adjuvant interleukin-12 gene therapy for the management of colorectal liver metastases.* Cancer Gene Ther. Vol. 11. 2004. 782-789.
182. Lizuka Y; Suzuki A; Kawakami Y; Toda M, *Augmentation of antitumor immune responses by multiple intratumoral inoculations of replication-conditional HSV and interleukin-12.* J Immunother. Vol. 27. 2004. 92-98.
183. Sharma S; Karakousin CP; Takita H; Shin K; Brooks SP, *Cytokines and chemokines are expressed at different levels in small and large murine colon-26 tumours following intratumoral injections of CpG ODN.* Neoplasia. Vol. 6. 2004. 523-528.
184. Kusnierczyk H; Zayos C; Chatzopoulos D, *Therapy for colorectal cancer.* NEJM. Vol. 352. 2005. 1820-1821.
185. Miller G; Bleier JI; Antonescu C; Pillarisetty VG; Shah B; Lahrs S; et al, *Natural killer cell depletion confounds the antitumor mechanisms of endogenous IL-12 overexpression.* Int J Cancer. Vol. 110. 2004. 395-402.

186. Tirapu I; Arina A; Mazzolini G; Duarte M; Alfaro C; Feijjo E; et al, *Improving efficacy of interleukin-12-transfected dendritic cell injected into murine colon cancer with anti CD137 monoclonal antibodies and alloantigens*. Int J Cancer. Vol. 110. 2004. 51-60.
187. Kuniyasu H; Ohmori H; Sasaki T; Sasahira T; Yoshida K; Kitadai Y; Fidler IJ, *Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis*. Clin Cancer Res. Vol. 9. 2003. 4802-4810.
188. Coca S; Enrech S; Moreno García V; Sáez MA; Gutiérrez C; Colmenarejo A; Hernández JM; Pérez Piqueras J, *Evaluation of the antitumor activity of interleukin-12 in an experimental murine model of cancer induced by 1,2 dimethylhydrazine (DMH)*. Rev Esp Enferm Dig (Madrid). Vol. 97. 2005. 619-628.
189. Wiseman H; Halliwell B, *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer*. Biochem J. Vol. 313. 1996. 17-29.
190. Zamora JD; Otárola IC; Brenes O, *La apoptosis y su relación con diversos nutrientes*. Rev Chil Nutr. Vol. 32. 2005. 178-190.
191. Qureshi A; Gorey TF; Byrne P; Kay E; McKeever J; Hennessy TPJ, *Oxygen free radical activity in experimental colonic carcinoma*. Br J Surg. Vol. 81. 2005. 1058-1059.
192. Wagner K; Elmadfa, *Biological relevance of terpenoids*. Ann Nutr Metab. Vol. 47. 2003. 95-106.
193. Li A; Ito I; Rovira K; Kim K; Takeda Z; Yu V; Ferrans T; Finkel, *A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis*. Am Heart Assoc. 1999. 304-310.
194. Watson W; Cai J; Jones D, *Diet and Apoptosis*. Ann Rev Nutr. Vol. 20. 2000. 485-505.
195. Salganik R, *The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population*. J Amer Coll Nutr. Vol. 20. 2001. 464S-472S.
196. Arce F; Gätjens-Boniche O ; Vargas E ; Valverde B ; Díaz C, *Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2*. Cancer Letters. Vol. 229. 2005. 271-281.
197. Dreher D; Junod AF, *Role of oxygen free radicals in cancer development*. Eur J Cancer. Vol. 32A. 1996. 30-38.
198. Albright CD; Salganik RI; Van Dyke T, *Dietary depletion of vitamin E and vitamin A inhibits mammary tumor growth and metastasis in transgenic mice*. J Nutr. Vol. 134. 2004. 1139-1144.
199. Salganik R; Albright C; Rodgers J; Kim J; Zeisel S; Sivashinskiy M; Gyke T, *Dietary antioxidant depletion: enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice*. Carcinogenesis. Vol. 21. 2000. 909-914.
200. Hanahan D; Weinberg RA, *The hallmarks of cancer*. Cell. Vol. 100. 2000. 57-70.
201. Shiozaki H; Oka H ; Inoue M; Tamjra S; Mondem M, *E-cadherina mediated adhesion system in human cancers*. Cancer. Vol. 77. 1996. 1605-1613.
202. Gabbert H, *Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations*. Cancer Metastasis Rev. Vol. 4. 1985. 293.



203. Spratt JS Jr; Spjut HJ, *Prevalence and prognosis of individual clinical and pathologic variables associated with colorectal carcinoma*. Cancer. Vol. 20. 1967. 1976.
204. Willett CG; Tepper JE; Cohen AM; Orlow E; Welch CE, *Failure patterns following curative resection of colonic carcinoma*. Ann Surg. Vol. 200. 1984. 685.
205. Curley SA; Carlson GW; Shumate CR; Winshow KT; Ames FC, *Extended resection for locally advanced colorectal carcinoma*. Am J Surg. Vol. 163. 1992. 553.
206. Gutman M; et al, *Biology of human colon cancer metastasis*. World J Surg. Vol. 19. 1995. 226-324.
207. Seefeld PH; Barga JA, *The spread of carcinoma of the rectum: invasion of lymphatics, veins, and nerves*. Ann Surg. Vol. 18. 1943. 76.
208. Gofuku J; Shiozaki H; Tsujinaka T; Inoue M; Tamura S; Doki Y; et al, *Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis*. Am J Clin Pathol. Vol. 111. 1999. 27-37.
209. Dorudi S; Sheffield JP; Poulsom R; Northover JM; Hart IR, *E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study*. Am J Pathol. Vol. 142. 1993. 981-986.
210. Karatzas G; Karayiannakis AJ; Syrigos KN; Chatzgianni E; Papanikolaou S; Riza F; et al, *E-cadherin expression correlates with tumor differentiation in colorectal cancer*. Hepatogastroenterology. Vol. 46. 1999. 232-235.
211. Ropponen KM; Eskelinen MJ; Lipponen PK; Alhava EM; Kosma MV, *Reduced expression of alpha catenin is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma*. J Clin Pathol. Vol. 52. 1999. 10-16.
212. Peifer M; Polakis P, *Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis: a look outside the nucleus* Science. Vol. 287. 2000. 1606-1609.
213. Ruoslahti E, *Integrins*. J Clin Invest. Vol. 87. 1991. 1.
214. Koretz K; Schlag P; Boumsell L; Moller P, *Expression of VLA-alpha 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. Vol. 138. 1991. 741.
215. Pignatelli M; Smith MEF; Bodmer WF, *Low expression Of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas*. Br J Cancer. Vol. 61. 1990. 636.
216. Frisch SM; Francis H, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. **124**: p. 619-626.
217. Chao C; Lotz MM; Clarke AC; Mercurio AM, *A function for the integrin alpha6beta4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells*. Cancer Res. Vol. 56. 1996. 4811-4819.
218. Agrez MV; Bates RC; Mitchell D; Wilson N; Ferguson N; Anseline P; et al, *Multiplicity of fibronectin-binding alpha V integrin receptors in colorectal cancer*. Br J Cancer. Vol. 73. 1996. 887-892.
219. Leffier H; Masiarz FR; Barondes SH, *Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family*. Biochemistry. Vol. 28. 1989. 9222.
220. Gabius HJ; Engelhardt R; Hellmann T, *Characterization of membrane lectins in human colon carcinoma cells by flow cytofluorometry, drug targeting and affinity chromatography*. Anticancer Res. Vol. 2. 1987. 109.

221. Byrn R; Medrek P; Thomas P, *Effect of heterogeneity of CEA on liver cell membrane binding and its kinetics of removal from circulation.* Cancer Res. Vol. 45. 1985. 3137.
222. Stamenkovic I; Aruffo A; Amiot M; Seed B, *The hematopoietic and epithelial forms of DC44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate bearing cells.* EMBO J. Vol. 10. 1991. 343.
223. Matsumura Y; Tarin D, *Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation.* Lancet. Vol. 340. 1992. 1053.
224. Nakajima M; Irimura T; Nicolson GL, *Heparanases and tumor metastasis.* J Cell Biochem. Vol. 36. 1988. 157.
225. Morikawa K; Walker SM; Nakajima M; Pathak S; Jessup JM; Fidler IJ, *Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice.* Cancer Res. Vol. 48. 1988. 6863.
226. Ogawa M; IK; Watanabe M; Etoh K; Kobayashi T; Takao Y; Anazawa S; Yamazaki Y, *Expression of matrix metalloproteinase 7, laminin and type IV collagen-associated liver metastases in human colorectal cancer : Immunohistochemical approach.* Hepato-Gastroenterol, 2005. **52**: p. 875-880.
227. Schwartz B; Bresalier RS; Kim YS, *The role of mucin in colon-cancer metastasis.* Int J Cancer. Vol. 52. 2006. 60.
228. Jessup MJ; Gallick GE, *The biology of colorectal carcinoma.* Curt ProN Cancer. Vol. 16. 1992. 265.
229. Benchimol S; Fuks S; John S; Beauchemine N; Shirota K; Stanners C.P, *Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule.* Cell, 1989. **57**: p. 327.
230. Folkman J, *Angiogenesis: initiation and modulation.* In *Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects.* G.L. Nicolson, L. Milas, editors New York Raven Press. 1984. 201-208.
231. Folkman J; Klagsburn M, *Angiogenic factors.* Science. Vol. 235. 1987. 442.
232. Koch AE; Polverini PS; Kunkle SL; et al, *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.* Science. Vol. 258. 1992. 1798.
233. Böhle AS; Kalthoff H, *Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis.* Langenbeck's Arch Surg. Vol. 384. 1999. 133-140.
234. Shweiki D; Itin A; Soffer D; Keshet E, *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.* Nature. Vol. 359. 1992. 843-845.
235. Rak J; Filmus J; Finkenzeller G; Grugel S; Marme D; Kerbel RS, *Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis.* Cancer Metastasis Rev, 1995. **14**: p. 699-703.
236. Rak J; Mitsuhashi Y; Bayko L; Filmus J; Shirasawa S; Sasazuki T; et al, *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VGF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis.* Cancer Res, 1995. **55**: p. 4575-4580.
237. Millauer R; Wizigmann-Voss S; Schnürch H; Martinez R; Moller NP; Risau W; et al, *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.* Cell. Vol. 72. 1993. 835-846.
238. Zabrenetsky V; Harns C; Steeg PS; Roberts DD, *Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression of melanoma, lung and breast carcinoma cell lines.* Int J Cancer. 1994. 191-195.

239. Kieser A; Wiech HA; Bradner G; Marme D; Kolch W, *Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression*. *Oncogene*. Vol. 9. 1994. 936-939.
240. Beck L; D'Amore PA, *Vascular development cellular and molecular regulation*. *FASEB J*. Vol. 11. 1997. 365-373.
241. Brooks PC; Montgomery AM; Rosenfeld M; Reisfeld RA; Hu T; Klier G; et al, *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. *Cell*. Vol. 79. 1994. 1157-1164.
242. Kim TS; Kim YB, *Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma*. *J Korean Med Sci*. Vol. 14. 1999. 263-270.
243. Bussolino F; Mantovani A; Persico G, *Molecular mechanisms of blood vessel formation*. *Trends Biochem Sci*. Vol. 22. 1997. 251-256.
244. O'Reilly MS; Holmgren L; Chen C; Folkman J, *Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mic*. *Nat Med*. Vol. 2. 1996. 689-692.
245. Arvelo F; Poupon MF, *Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa*. *Act Cient Venezol*. Vol. 52. 2001. 304-312.
246. Herter FP; Slanetz C.A, *Patterns and significance of lymphatic spread from cancer of the colon and rectum*. In *Lymphatic System Metastasis*. L. Weiss, H.A. Gilbert, S.C. Ballon, editors. Boston, G.K. Hall, 1980.
247. Willis R.A, *The Spread of Tumor in the Human Body*. London Butterworth, 1972.
248. Fidler IJ, *Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine*. *J Natl Cancer Inst*. Vol. 45. 1970. 773.
249. Weiss L, *Metastatic inefficiency: causes and consequences*. *Cancer Rev*, 1986. **3**: p. 1.
250. Schackert H; Fidler LJ, *Development of an animal model to study the biology of recurrent colorectal cancer originating from mesenteric lymph system metastasis*. *Int J Cancer*. Vol. 44. 1989. 177.
251. Sánchez-Rovira P; Jiménez E; Carracedo J; Barneto IC; Ramírez R; Aranda E, *Serum levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity*. *Eur J Cancer*. Vol. 34. 1998. 394-398.
252. Velikova G; Banks RE; Gearing A; Hemingway I; Forbes MA; Preston SR; et al, *Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer*. *Br J Cancer*. Vol. 77. 1998. 1857-1863.
253. Weiss L; Grundmann E; Torhorst J; et al, *Hematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies*. *J Pathol*. Vol. 150. 1986. 195.
254. Price JE; Tarin D; Fidler IJ, *The influence of organ microenvironment on pigmentation of a metastatic murine melanoma*. *Cancer Res*. Vol. 48. 1988. 2258.
255. Nicolson GL, *Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **948**: p. 175.
256. Updyke TV; Nicolson GL, *Malignant melanoma lines selective in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential*. *Clin Exp Metastasis*. Vol. 4. 1986. 231.

257. Gasic GJ, *Role of plasma, platelets and endothelial cells in tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev. Vol. 3. 1984. 99.
258. Fidler IJ; Bucana C, *Mechanism of tumor cell resistance to lysis by lymphocytes*. Cancer Res. Vol. 37. 1977. 3945.
259. Wittig BM; Kaulen H; Thees R; Schmitt C; Knolle P; Stock J; et al, *Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer*. Eur J Cancer. Vol. 32. 1996. 1215-1218.
260. Hoff S.D; Matsushita Y; Ota DM; Cleary KR; Yamori T; Hakomori S; et al, *Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma*. Cancer Res. Vol. 49. 1989. 6883-6888.
261. Nakamori S; Kameyama M; Imaoka S; Furukawa H; Ishikawa O; Sasaki Y; et al, *Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis*. Dis Colon Rectum. Vol. 40. 1997. 420-431.
262. Wielenga VJ; Heider KH; Offerhaus GF; Adolf GR; Van den Berg FM; Ponta H; et al, *Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression*. Cancer Res. Vol. 53. 1993. 4754-4756.
263. Yamaguchi A; Urano T; Goi T; Saito M; Takeuchi K; Hirose K; et al, *Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients*. J Clin Oncol. Vol. 14. 1996. 1122-1127.
264. Masson D; Denis MG; Denis M; Blanchard D; Loirat MJ; Cassagnau E; et al, *Soluble CD44: quantification and molecular repartition in plasma of patients with colorectal cancer*. Br J Cancer. Vol. 80. 1999. 1995-2000.
265. Nicolson GL; Dulski K.M, *Organ specificity of metastatic tumor colonization is related to organ-selective growth properties of malignant cells*. Int J Cancer, 1986. **38**: p. 289.
266. Beahrs OH; Phillips JW; Dockerty MB, *Implantation of tumor cells as a factor in recurrence of carcinoma of the rectosigmoid: report of four cases with implantation at dentate line*. Cancer. Vol. 258. 1985. 578.
267. LeQuesne LP; Thompson AD, *Implantation recurrence of carcinoma of rectum and colon*. N Engl J Med. Vol. 258. 1958. 578.
268. Boreham P, *Implantation metastases from cancer of the large bowel*. Br J Cancer. Vol. 46. 1958. 103.
269. Pomeranz AA; Garlock JH, *Postoperative recurrence of cancer of colon due to desquamated malignant cells*. JAMA. Vol. 158. 1955. 1434.
270. Fu X; Besterman J M; Monosov A; Hoffman R M, *Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. **88**: p. 9345-9349.
271. Forman H J; Beveris J, *Superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria*. In: Pryor W A ed Free radicals in Biology New York academia Press. Vol. 5. 1982. 65-90.
272. Hann B; Balmain A, *Building "validated" mouse models of human cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**: p. 778-784.
273. Beazer-Barclay Y; Levy DB; Moser AR; et al, *Sulindac suppresses tumorigenesis in the Min mouse*. Carcinogenesis. Vol. 17. 1996. 1757-60.
274. Luongo C; Moser AR; Gledhill S; Dove WF, *Loss of Apc+ in intestinal adenomas from Min mice*. Cancer Res. Vol. 54. 1994. 5947-5952.
275. Levy DB; Smith KJ; Beazer-Barclay Y; Hamilton SR; Vogelstein B; Kinzler KW, *Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors*. Cancer Res. Vol. 54. 1994. 5953-5958.

276. Moser AR; Shoemaker AR; Connelly CS; et al, *Homozygosity for the Min allele of Apc results in disruption of mouse development prior to gastrulation*. Dev Dyn. Vol. 203. 1995. 422-433.
277. Dove WF; Gould KA; Luongo C; Shoemaker AR, *Emergent issues in the genetics of intestinal neoplasia*. Cancer Surv. Vol. 25. 1995. 335-55.
278. Jacoby RF; Marshall DJ; Newton MA; et al, *Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the Apc Min mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam*. Cancer Res. Vol. 56. 1996. 710-714.
279. Sausville EA; Lush RD; Headlee D; et al, *Clinical pharmacology of UCN-01: Initial observations and comparison to preclinical models*. Cancer Chemother Pharmacol. Vol. 42 (Suppl). 1998. S54-S59.
280. Sausville EA; Arbuck SG; Messmann R; et al, *Phase I trial of 72-hour continuous infusion UCN-01 in patients with refractory neoplasms*. J Clin Oncol. Vol. 19. 2001. 2319-2333.
281. Fuse E; Tanii H; Kurata N; et al, *Unpredicted clinical pharmacology of UNC-01 caused by specific binding to human alpha1-acid glycoprotein*. Cancer Res. Vol. 58. 1998. 3248-3253.
282. Fuse E; Tanii H; Takai K; et al, *Altered pharmacokinetics of a novel anticancer drug, UCN-01, caused by specific high affinity binding to alpha1-acid glycoprotein in humans*. Cancer Res. Vol. 59. 1999. 1054-1060.
283. Xie W; Barwick JL; Downes M; et al, *Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR*. Nature. Vol. 406. 2000. 435-439.
284. Oshima M; Oshima H; Kobayashi M; Tsutsumi M; Taketo MM, *Evidence against dominant negative mechanisms of intestinal polyp formation by Apc gene mutations*. Cancer Res, 1995. **55**: p. 2719-22.
285. Yang J; shikata N; Mizouka H; Tsubura A, *Colon carcinogenesis in shrews by intrarctal infusion of N-methyl-N-nitrosourea*. Cancer Lett, 1996. **110**: p. 105-112.
286. Meuwissen R; Jonkers J; Berns A, *Mouse models for sporadic cancer*. Exp Cell Res, 2001. **264**: p. 100-110.
287. Jonkers J; Berns A, *Conditional mouse models of sporadic cancer*. Nat Rev Cancer. Vol. 2. 2002. 251-265.
288. Rudolph KL; Millard M; Bosenberg MW; DePinho RA, *Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans*. Nat Genet. Vol. 28. 2001. 155-159.
289. Kim NW; Piatyszek MA; Prowse KR; et al, *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science. Vol. 266. 1994. 2011-2015.
290. Van Dyke T; Jacks T, *Cancer modeling in the modern era: Progress and challenges*. Cell. Vol. 108. 2002. 135-144.
291. Artandi SE; Chang S; Lee SL; et al, *Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice*. Nature. Vol. 406. 2000. 641-645.
292. Fu XY; Besterman JM; Monosov A; Hoffman RM, *Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 88. 1991. 9345-9349.
293. Kuo TH; Kubota T; Watanabe M; Furukawa T; Teramoto T; Ishibiki K; Kitajima M; Moossa AR; Penman S; Hoffman RM, *Liver colonization competence governs colon cancer metastasis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 12085-12089.

294. Wilmanns C; Fan D; O'Brian CA; Bucana CD; Fidler IJ, *Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil*. Int J Cancer. Vol. 52. 1992. 98-104.
295. Dong Z; Radinsky R; Fan D; Tsan R; Bucana CD; Wilmanns C; Fidler IJ, *Organ-specific modulation of steady-state mdr gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells*. J Natl Cancer Inst. Vol. 86. 1994. 913-920.
296. Fidler IJ; Wilmanns C; Staroselsky A; Radinsky R; Dong Z; Fan D, *Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment*. Cancer Metast Rev. Vol. 13. 1994. 209-222.
297. Killion JJ; Radinsky R; Fidler IJ, *Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice*. Cancer Metast Rev. Vol. 17. 1998. 279-284.
298. Davies G; Duke D; Grant A G; Kelly S A; Hermon-Taylor J, *Growth of human digestive-tumors xenografts in athymic nude rats*. Br. J. Cancer. Vol. 43. 1981. 53.
299. Fichtner I; Slisow W; Gill J; Becker M; Elbe B; Hillebrand T; Bibby M, *Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas*. Eur. J. Cancer. Vol. 40. 2004. 298-307.
300. Céspedes M V; Espina C; García-Cabezas M A; Trías M; Boluda A; Gómez del Pulgar M T; Sancho F J; Nistal M; et al, *Orthotopic Microinjection of Human Colon Cancer Cells in Nude Mice Induces Tumor Foci in All Clinically Relevant Metastatic Sites*. Am. J. Pathol. Vol. 170. 2007. 1077-1085.
301. Flatmark K; Maelandsmo G M; Martinsen M; Rasmussen H; Fodstad O, *Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice*. Eur J Cancer. Vol. 40. 2004. 1593-1598.
302. Thalheimer A; Illert B; Bueter M; Gattenlohner S; Stehle D; Thiede A; Waaga-Gasser A M; Meyer D, *Feasibility and limits of an orthotopic human colon cancer model in nude mice*. Comp Med. Vol. 56. 2006. 105-109.
303. Wei-Chang Chen; Mao-Song Lin; Bao-Feng Zhang; Jing Fang; Qiong Zhou; Ying Hu; Heng-Jun Gao, *Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(5): p. 699-708.
304. Pirani Carneiro F; Zambelli Ramalho LN; Britto-Garcia S; Ribeiro-Silva A; Zucoloto S, *Immunohistochemical Expression of p16, p53, and p63 in Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas*. Dis Colon Rectum. Vol. 49. 2006. 588-594.
305. Ishida H; et al, *Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer*. Cancer Lett. Vol. 207. 2004. 109-115.
306. Liang JT; et al, *Microvessel density, ciclo-oxygenase 2 expression, K-ras mutation and p53 overexpression in colonic cancer*. Br J Surg. Vol. 91. 2004. 355-361.
307. O'Brien C A; Pollet A; Galliger S; Dick J E, *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature. Vol. 445. 2007. 106-110.
308. Chen WC; Lin MS; Zhang BF; Fang J; Zhou Q; Hu Y; Gao HJ, *Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray*. World J Gastroenterol. Vol. 13. 2007. 699-708.

309. Sasaki CY; Lin H; Morin PJ; Longo DL, *Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin*. Cancer Res. Vol. 60. 2000. 7057-7065.
310. Tuncel H; Shimamoto F; Cagatay P; Kalkan MT, *Variable E-Cadherin Expression in a MNU-Induced Colon tumor Model in Rats Which Exposed with 50 Hz frequency Sinusoidal Magnetic Field*. Exp. Med. Vol. 198. 2003. 245-249.
311. Okamoto A; Demetrick DJ; Spillare EA; et al, *Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer*. Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 23. 1994. 11045-11049.
312. Caldés T; Godino J; Sánchez A; Corbacho C; De la Hoya M; López Asenjo J; Sáez C; et al, *Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer*. Oncol Rep. Vol. 12. 2004. 621-629.
313. Hampel H; Frankel WL; Martin E; Arnold M; Khanduja K; Kuebler P; Nakagawa H; Sotamaa K; Prior TW; Westman J; Panescu J; et al, *Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer)*. N Engl J Med, 2005. **352**: p. 1851-1860.
314. Vasen HFA; Mösllein G; Alonso A; Bernstein I; Bertario L; Blanco I; Burn J; et al, *Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer)*. Journal of Medical Genetics. Vol. 44. 2007. 353-362.
315. Boland CR; Thibodeau SN; Hamilton SR; Sidranky D; Eshleman JR; Burt RW; et al, *National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familiar predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**: p. 5248-5257.
316. Mihaylova V T; Bindra R S; Yuan J; Campisi D; Narayanan L; Jensen R; et al, *Decreased Expression of the DNA Mismatch Repair Gene Mlh1 under Hypoxic Stress in Mammalian Cells*. Moll. Cell. Biol. Vol. 23. 2003. 3265-3273.
317. Chang C L; Marra G; Chauchan D; HA H T; Chang D K; et al, *Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system*. AJP- Cell Physiol, 2002. **283**: p. C148-C154.
318. Moghadasian MH; Freeman HJ; Godin DV, *Endogenous antioxidant status in neoplastic and adjacent tissues in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats: effects of olsalazine*. Carcinogenesis. Vol. 17. 1996. 983-987.
319. Dreher D; Junod AF, *Role of oxygen free radicals in cancer development*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(1): p. 30-38.
320. Butke TM; Sandstrom PA. Free Radical Res. Vol. 22. 1995. 389-397.
321. Nonaka Y; Iwagaki H; Kimura T; Fuchimoto S; Orita K, *Effect of reactive oxygen intermediates on the in vitro invasive capacity of tumor cells and liver metastasis in mice*. Int J Cancer, 1993. **54**(6): p. 983-986.
322. Manju V; Balasubramaniyan V; Nalini N, *Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1,2-dimethylhydrazine challenge*. Cell Mol Biol Lett. Vol. 10. 2005. 535-551.
323. Ashokkumar P; Sudhandiran G, *Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis*. Biomed Pharmacother. Vol. 62. 2008. 590-597.

324. Aranganathan S; Panneer Selvam J; Nalini N, *Hesperetin exerts dose dependent chemopreventive effect against 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis*. Invest New Drugs. Vol. 27. 2009. 203-213.
325. Sreedharan V; Venkatachalam KK; Namasivayam N, *Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis*. Invest New Drugs. Vol. 27. 2009. 21-30.
326. Kanwar SS; Vaiphei K; Nehru B; Sanyal SN, *Antioxidative effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs during the initiation stages of experimental colon carcinogenesis in rats*. J Environ Pathol Toxicol Oncol. Vol. 27. 2008. 89-100.
327. Deeptha K; Kalaleeswari M; Sengottuvelan M; Nalini N, *Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2-dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats*. Invest New Drugs. Vol. 24. 2006. 479-488.
328. Sturm JW; Magdeburg R; Berger K; Petruch B; Samel S; Bönninghoff R; Keese M; Hafner M; Post S, *Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model*. Int J Cancer, 2003. **107**: p. 11-21.
329. ten Kate M; Hofland LJ; van Grevenstein WMU; van Koetsveld PV; Jeekel J; van Eijck CHJ, *Influence of proinflammatory cytokines on the adhesion of human colon carcinoma cells to lung microvascular endothelium*. Int J Cancer, 2004. **112**: p. 943-950.
330. Larmonier N; Cathelin D; Larmonier C; Nicolas A; Merino D; Janikashvili N; Audia S; et al, *The inhibition of TNF-alpha anti-tumoral properties by blocking antibodies promotes tumor growth in a rat model*. Exp Cell Res. Vol. 313. 2007. 2345-2355.
331. Zhang M; Qian J; Xing X; Kong FM; Zhao L; Chen M; Lawrence TS, *Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha pathway is radioprotective for the lung*. Clin Cancer Res. Vol. 14. 2008. 1868-1876.
332. Jones SC; Banks RE; Haidar A, *Adhesion molecules in inflammatory bowel disease*. Gut. Vol. 36. 1995. 724-730.
333. Meager A, *Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation*. Cytokine Growth Factor Rev. Vol. 10. 1999. 27-39.
334. Zetter BR, *The cellular basis of site-specific tumor metastasis*. N Engl J Med. Vol. 322. 1990. 605-612.
335. Hofer SOP; Shroyer D; Reichner JS; Hoekstra HJ; Wanebo HJ, *Wound-induced tumor progression. A probable role in recurrence after resection*. Arch Surg. Vol. 133. 1998. 383-389.
336. van Rossen MEE; Hofland LJ; van der Tol MP; van Koetsveld PM; Jeekel J; Marquet RL; van Eijck CHJ, *Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum*. J Pathol. Vol. 193. 2001. 530-537.
337. Carmeliet P; Jain RK, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature (Lond). Vol. 407. 2000. 249-257.
338. Orr FW; Wang HH; Lafrenie RM; Scherbarth S; Nance DM, *Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis*. J Pathol. Vol. 190. 2000. 310-329.
339. Kostenuik PJ; Orr FW; Suyama K; Singh G, *Increased growth rate and tumor burden of spontaneously metastatic Walker 256 cancer cells in the skeleton of bisphosphonate-treated rats*. Cancer Res. Vol. 53. 1999. 5452-5457.



340. Kitakata H; Nemoto-Sasaki Y; Takahashi Y; Kondo T; Mai M; Mukaida N, *Essential Roles of Tumor Necrosis Factor Receptor p55 in Liver Metastasis of Intrasplenic Administration of Colon 26 Cells*. Cancer Research. Vol. 62. 2002. 6682-6687.
341. Jonjic N; Peri G; Mantovani A; et al, *Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells*. J Exp Med. Vol. 176. 1992. 1165-1174.
342. Klein CL; Bittinger F; Kirkpatrick CJ; et al, *Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells*. Pathobiology. Vol. 63. 1995. 204-212.
343. Garcia J; Callewaert N; Borsig L, *P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells*. Oxford University Press. 2006.
344. Kurata M; Okajima K; Kawamoto T; Uchiba M; Ohkohchi N, *Antithrombin reduces reperfusion-induced hepatic metastasis of colon cancer cells*. World J Gastroenterol. Vol. 12. 2006. 60-65.
345. Vainer B; Nielsen OH; Horn T, *Subcellular localization of intercellular adhesion molecule-1 in colonic mucosa in ulcerative colitis*. Ultrastruct Pathol. Vol. 26. 2000. 113-121.