

## REVISIÓN

# Nuevos factores pronósticos y predictivos en el cáncer colorrectal avanzado



Ignacio Gil-Bazo<sup>a</sup>, José Antonio Páramo<sup>b</sup> y Jesús García-Foncillas<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Oncología, Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra.

<sup>b</sup>Servicio de Hematología, Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona, Navarra, España.

Los pacientes con cáncer presentan una tendencia a experimentar episodios tromboembólicos. Los tumores gastrointestinales son más susceptibles a este tipo de alteraciones. Recientemente se ha estudiado la participación en el desarrollo angiogénico tumoral de la activación de los sistemas de la coagulación, la fibrinólisis y el plasminógeno. Factores causantes de la activación de estos sistemas como el factor Von Willebrand, el fibrinógeno, el inhibidor del activador de plasminógeno de tipo 1, el dímero D y el factor de crecimiento del endotelio vascular han ganado valor como posibles predictores de respuesta al tratamiento oncológico y como elementos pronósticos de supervivencia en pacientes con carcinoma colorrectal. En esta revisión se analiza la evidencia que avala el uso de estas proteínas en la valoración pronóstica y predictiva del cáncer colorrectal.

**Palabras clave:** Cáncer colorrectal, Hemostasia, Angiogénesis, Pronóstico, Supervivencia.

New prognostic and predictive factors in advanced colorectal cancer

Cancer patients often show a clinical tendency to thromboembolic events. This tendency is due to tumor cell-related factors together with the damage of the vascular endothelial factors exerted by chemotherapy treatment. Gastrointestinal tumors especially contribute to these types of events. More recently, the implication of tumor angiogenesis in clotting/fibrinolysis and plasminogen systems activation has been addressed in cancer patients. Finally, some hemostasis and angiogenesis-related factors such as platelets, von Willebrand factor, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor type-1, D dimer, and vascular endothelial growth factor have been highlighted as new potential response and survival predictors in colorectal cancer patients. In this review article, the current evidence supporting the use of these proteins in assessing prognosis in colorectal cancer patients is critically exposed and discussed.

**Key words:** Colorectal cancer, Hemostasis, Angiogenesis, Prognosis, Survival.

A pesar de los avances recientes, el cáncer colorrectal (CCR) sigue siendo un problema importante de salud pública en el mundo desarrollado. Se calcula que representa un 10-15% de los nuevos casos anuales de cáncer. Sólo en EE.UU., durante el año 2005, se estima que se diagnosticaron casi 150.000 nuevos casos de CCR, y alrededor de 56.000 pacientes fallecieron por esta causa<sup>1</sup>. Aproximadamente el 15% de los afectados de CCR presenta metástasis en el momento de su diagnóstico, y alrededor de la mitad de los pacientes con enfermedad inicialmente localizada en el colon o recto desarrolla con el tiempo, a pesar de los tra-

tamientos aplicados, enfermedad diseminada<sup>2</sup>. Sólo una pequeña parte de los pacientes con CCR metastásico puede llegar a curarse mediante resección quirúrgica completa de la enfermedad, si es oligometastásica, pero la gran mayoría fallece de cáncer en menos de 2 años. De hecho, únicamente un 3% de los pacientes con enfermedad diseminada sigue vivo a los 5 años de su diagnóstico.

Como consecuencia de ello, el carcinoma de colon y recto es la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer en EE.UU.<sup>3</sup>, y también en España<sup>4</sup>, donde la tasa bruta de mortalidad por CCR es de 31,7 varones y 24,7 mujeres por cada 100.000 habitantes y año, casi 10 puntos por encima de la estadounidense.

Por lo tanto, disponer de nuevas técnicas poco invasivas que permitan conocer el pronóstico de supervivencia de los pacientes con CCR metastásico en el momento del diagnóstico, y más aún las expectativas de respuesta a los distintos tratamientos que se pretende administrar, es de gran importancia en la planificación de los recursos terapéuticos y de los cuidados de estos pacientes.

### Marcadores tumorales clásicos: evaluación pronóstica y seguimiento clínico

La primera proteína soluble que demostró una cierta utilidad en el pronóstico y el seguimiento del CCR avanzado fue el antígeno carcinoembrionario (CEA). Más recientemente se ha evaluado también el hidrato de carbono 19.9 (CA-19.9) con el mismo propósito. En los últimos años se ha llevado a cabo múltiples estudios para intentar evaluar la capacidad predictiva y pronóstica de los valores séricos de ambos en pacientes con CCR<sup>5-17</sup>. Sin embargo, la mayoría de estos estudios ha intentado buscar el mejor marcador tumoral con capacidad para pronosticar las tasas de recidiva y de supervivencia global en tumores localizados o localmente avanzados que son tratados con cirugía. Pocos autores<sup>8,11,12,17</sup> han empleado la determinación sérica de las proteínas CEA y CA-19.9 para predecir la respuesta a la quimioterapia o anticipar la supervivencia de los pacientes con CCR metastásico. Por una parte, tanto Berglund et al<sup>8</sup> como Hyodo et al<sup>11</sup> desaconsejan el empleo seriado de estos marcadores tumorales en el seguimiento clínico de los pacientes con CCR en tratamiento con quimioterapia, ya que no han encontrado una correlación entre los valores prequimioterapia de ambos y la respuesta al tratamiento en el primer caso, o por haber observado una baja sensibilidad (45%) y especificidad (88%) de los valores de CEA para predecir la respuesta de la enfermedad al tratamiento en el segundo. Más recientemente, Yuste et al<sup>17</sup> han determinado los valores séricos de CEA y CA-19.9 en pacientes con CCR metastásico antes de comenzar quimioterapia con 5-fluorouracilo y leucovorín y los han relacionado con el tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad y con la supervivencia global. Observaron que ambos parámetros estaban estrechamente relacionados con el tiempo hasta la

Este trabajo ha sido financiado con una beca de investigación biomédica del Gobierno de Navarra (19/2003).

Correspondencia: Dr. I. Gil-Bazo, Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, Box 241, New York, NY 10021, USA. Correo electrónico: gilbazo@mskcc.org

Recibido el 11-7-2006; aceptado para su publicación el 30-9-2006.

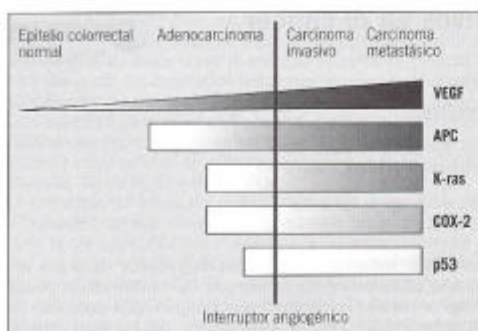


Fig. 1. Representación de la evolución fenotípica del tejido colónico pretumoral y tumoral, con la mediación del interruptor angiogénico (angiogenic switch) y la contribución del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el gen APC (poliposis colónica adenomatosa), la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y los oncogenes K-ras y p53.

progresión. Además, en el caso de la supervivencia, ésta se vio ligada a los valores de ambas proteínas por igual, tanto en el análisis univariante como en el multivariante.

De forma similar, Duffy et al<sup>11</sup>, en una revisión histórica sobre la utilidad de los marcadores bioquímicos en el CCR, recomiendan el empleo de los valores de CEA cada 2 o 3 meses como parámetro de seguimiento válido en pacientes con enfermedad metastásica durante el tratamiento.

Por lo tanto, hasta ahora no se ha validado la utilidad del empleo sistemático y exclusivo de ambos marcadores en el seguimiento de la respuesta de los pacientes con CCR avanzado que reciben quimioterapia<sup>5,18,20</sup>, y por el momento se recomienda su uso periódico junto con las técnicas de imagen estándar.

También son recientes los estudios que buscan nuevos factores, séricos o plasmáticos, predictivos de respuesta al tratamiento y pronósticos de supervivencia en el CCR diseminado. Son especialmente interesantes los desarrollados en el campo de la angiogénesis tumoral y de la activación de los sistemas de la coagulación, de la fibrinólisis y del sistema del plasminógeno. En estos últimos factores, más novedosos, se centra el presente trabajo de revisión.

#### Implicación predictiva y pronóstica del desarrollo angiogénico: VEGF y PAI-1

##### Desarrollo angiogénico tumoral

La angiogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes<sup>21</sup>. En determinadas situaciones fisiológicas, como la ovulación, el desarrollo embrionario o la cicatrización de heridas, es un proceso fundamental que se encuentra bajo un estricto control, es decir, se estimula en breves y cortos períodos y a continuación se inhibe completamente<sup>22</sup>. Una desregulación del proceso angiogénico puede originar diversas enfermedades, como la artritis reumatoide<sup>23</sup>, la retinopatía diabética<sup>24</sup>, la psoriasis, el hemangioma juvenil<sup>25</sup> y el desarrollo tumoral<sup>26</sup>.

El crecimiento tumoral se inicia con la pérdida del control de la proliferación celular. Las células tumorales empiezan a dividirse rápidamente dando origen a un carcinoma *in situ*. Al aumentar la masa tumoral, las células se encuentran cada vez más alejadas de los capilares y, finalmente, el tumor deja de crecer por falta de nutrientes y oxígeno<sup>27</sup>. Con el tiempo, el carcinoma *in situ* puede adquirir un fenotipo

angiogénico que induce la formación de nuevos capilares y comienza a invadir el tejido próximo. La adquisición de este fenotipo depende del equilibrio entre factores angiogénicos positivos y negativos. Este fenómeno se conoce como *angiogenic switch* o interruptor angiogénico<sup>21</sup>. Así, el fenotipo angiogénico puede ser adquirido por una alta producción de factores de crecimiento o por una baja expresión de moduladores negativos. Esta evolución fenotípica queda representada en la figura 1, siguiendo los criterios de Guba et al<sup>28</sup>. Tanto en situaciones normales como en las patológicas, la hipoxia es el principal motivo de inicio de la angiogénesis. La última etapa del crecimiento tumoral es la formación de metástasis<sup>22</sup>. La neovascularización facilita la posible entrada en la circulación de las células tumorales y, por tanto, su diseminación a otros órganos<sup>29</sup>.

La síntesis de nuevos vasos sanguíneos requiere varios pasos que se suceden de una manera secuencial: inicio de la respuesta angiogénica, rotura de la membrana basal y degradación de la matriz extracelular (MEC), migración y proliferación celulares, interacción célula-célula y célula-matriz y remodelado vascular<sup>30</sup>.

Los componentes de la MEC están regulados por la cascada angiogénica. La hipótesis formulada por Folkman en 1971 acerca de que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis condujo al concepto de factores angiogénicos de crecimiento tumoral. Se han identificado muchos factores de crecimiento, citocinas y otras proteínas reguladoras que estimulan el crecimiento endotelial, tanto de forma directa como indirecta. Entre ellos, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos han recibido una mayor atención debido a sus elevadas eficacia y especificidad, por lo que representan una de las claves en la regulación de la angiogénesis.

El VEGF inicialmente se denominó factor de permeabilidad vascular por su capacidad de permeabilizar los vasos sanguíneos, lo que permite la salida de proteínas plasmáticas<sup>31</sup>. Este proceso incluye la formación de orificios<sup>32</sup> y canales a partir de orgánulos vesiculovacuolares. Todo esto contribuye a la formación de una red proteica extravascular que constituye una matriz que soporta el crecimiento de células endoteliales y tumorales<sup>33</sup>. Además de inducir vasodilatación y permeabilidad vascular, el VEGF puede estimular la síntesis de proteasas o de importantes receptores implicados en la invasión, la proliferación, la migración celular y el remodelado tisular. De esta forma, el VEGF interviene en 3 procesos funcionales básicos de la angiogénesis tumoral<sup>31</sup>: activación del sistema de coagulación, interacciones de adhesión entre integrinas de superficie endotelial y MEC, y control de la proteólisis extracelular.

La familia VEGF está constituida por 6 miembros: VEGF-A (también denominado VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF o factor de crecimiento de la placenta<sup>34</sup>. Estructuralmente, los VEGF son homodímeros compuestos por cadenas polipeptídicas que, en su estructura general y en el espaciado de los residuos cisteína, se relacionan con los factores de crecimiento derivados de las plaquetas. La inducción de la transcripción de VEGF por la hipoxia está mediada por la unión del factor inducible por hipoxia de tipo 1 al promotor de VEGF<sup>35</sup>.

Se ha comprobado que los oncogenes pertenecientes a la familia ras/MAP-quinas potencian la expresión de VEGF no asociada a hipoxia<sup>36</sup>. También se ha observado una sobreexpresión de VEGF por la inactivación de p53<sup>36</sup>.

Los efectos biológicos de VEGF están mediados por su unión a 3 receptores específicos de la superficie celular relacionados de forma estructural: VEGF-R1 o Flt-1, VEGF-R2, KDR o Flk-1 y VEGF-R3 o Flt-4. R1 y R2 son esenciales

para el desarrollo vascular y se expresan principalmente en el endotelio vascular, mientras que R3 se localiza en el endotelio linfático (fig. 2). Las concentraciones de oxígeno regulan la expresión de R1 y R2.

A pesar de que el VEGF<sup>34</sup> es el más potente factor inductor de angiogénesis de origen tumoral conocido, otras proteínas como el factor de crecimiento de fibroblastos, las angiopoietinas, el factor de crecimiento tumoral beta, el factor de crecimiento de hepatocitos, las citocinas CXc y el factor de necrosis tumoral alfa, entre otros, poseen capacidad para estimular la proliferación y la diferenciación del endotelio vascular.

En la rotura de la membrana basal y la degradación de la MEC que sucede en el proceso angiogénico, se ha de considerar la contribución fundamental del sistema activador del plasminógeno. El sistema activador del plasminógeno es un sistema de proteasas que incluye tanto a la enzima activadora del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA) como al activador tisular de plasminógeno (t-PA). Aunque ambos tienen como sustrato el plasminógeno, t-PA regula principalmente la actividad fibrinolítica, mientras que u-PA tiene un papel más importante en el remodelado tisular<sup>35</sup>. La interacción de u-PA activa con su receptor localiza la actividad enzimática en la superficie, en los denominados «sitios de anclaje focal», lo que acelera la síntesis de plasmina y estimula una señal de transducción que conduce a la invasión celular<sup>36</sup>, ya que la plasmina es capaz de degradar la membrana basal y la MEC, y de activar diversos factores de crecimiento. La actividad de u-PA puede ser bloqueada por los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI-1 o PAI-2) principalmente.

La enzima activadora del plasminógeno es secretada junto a sus inhibidores, lo que asegura un control de la actividad proteolítica para conservar la estructura normal del tejido. Sin embargo, este equilibrio se pierde durante el crecimiento tumoral y el proceso de metástasis. La intervención de los distintos factores y sus relaciones se representan en la figura 3.

**Capacidad predictiva y pronóstica del VEGF en el cáncer colorrectal metastásico**

En los últimos 10 años se ha realizado una intensa búsqueda de nuevos marcadores biológicos, como el VEGF, que permitan el seguimiento evolutivo de los pacientes con CCR<sup>37,38,39</sup> y complementen la información de las técnicas de imagen que habitualmente se realizan de forma periódica a

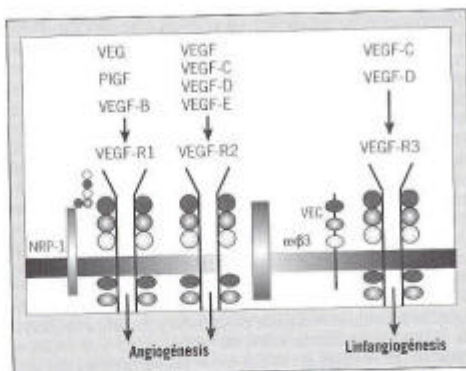


Fig. 2. Interacción entre el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores (VEGF-R). Resumen de ligandos, receptores y acciones principales. PlGF: factor de crecimiento de la placenta; NRP-1: neuropilina 1; VEGC: células del endotelio vascular; avb3: integrina de membrana avb3.

estos pacientes. Sin embargo, son pocos los estudios realizados hasta el momento para intentar esclarecer el papel predictivo de progresión y pronóstico de supervivencia de los valores de VEGF antes y durante la quimioterapia en pacientes diagnosticados de CCR metastásico<sup>40,41,42,43</sup>. Hyodo et al<sup>43</sup> analizaron los títulos plasmáticos de VEGF en 70 pacientes afectados de tumores gastrointestinales antes del tratamiento citostático. De ellos, sólo 18 presentaban CCR metastásico. Dichos autores observaron que los pacientes con valores altos de VEGF presentaban un peor pronóstico en términos de respuesta a la quimioterapia. Berglund et al<sup>44</sup> midieron de forma seriada los valores séricos de VEGF en 87 pacientes con CCR en estadio IV antes y durante la quimioterapia de primera línea con 5-fluorouracilo y leucovorin. En un 94% de los pacientes, las concentraciones de VEGF disminuyeron durante el tratamiento, pero no encontraron una asociación entre este descenso y la respuesta de las lesiones durante el tratamiento, ni con la supervivencia global de los pacientes. El estudio más reciente, desarrollado por Lissoni et al<sup>45</sup>, incluyó a un total de 90 pacientes con enfermedad metastásica, de los que 59 estaban diagnosticados

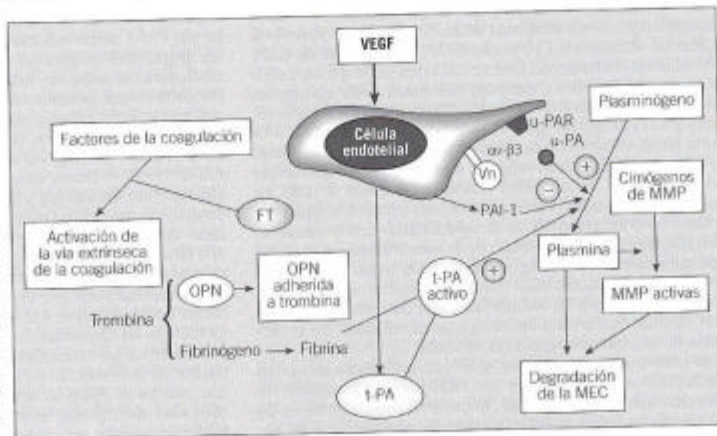


Fig. 3. Interacciones entre la célula endotelial activada, el sistema de la coagulación, el sistema del plasminógeno y las metaloproteinasas de matriz (MMP). VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; FT: factor tisular; OPN: opsonina; u-PA: activador del plasminógeno tipo urocinasa; t-PA: activador tisular del plasminógeno; Vn: vitronectina; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno; MEC: matriz extracelular; avb3: integrina de membrana avb3.

de carcinoma no microcítico de pulmón y 31 de CCR. Estos últimos recibieron tratamiento únicamente con irinotecán. Casi la mitad de los pacientes antes del tratamiento presentó concentraciones séricas de VEGF elevadas más de dos desviaciones estándar con respecto a los voluntarios sanos. Además, los pacientes que presentaban mayores concentraciones antes de la quimioterapia tuvieron una tasa de respuesta al tratamiento inferior a los pacientes que tenían concentraciones similares a los controles antes del tratamiento. Por último, comprobaron que los pacientes en quienes se normalizaron los valores de VEGF con la administración de irinotecán presentaron mayor tasa de respuesta radiológica de la enfermedad al tratamiento y superior tasa de supervivencia a un año.

No obstante, en ninguno de estos estudios se ha analizado específicamente el riesgo de progresión y muerte asociado a las distintas concentraciones de VEGF antes y durante el tratamiento, ni éstas en relación con las variaciones durante la administración de quimioterapia. Tampoco estos autores han propuesto concentraciones de corte concretas de VEGF para definir un peor pronóstico. Además, en ningún caso se han realizado investigaciones similares con nuevas combinaciones de agentes quimioterápicos potencialmente más activas.

Por lo expuesto, la determinación de VEGF con intención de pronosticar la evolución clínica de los pacientes con cáncer se ha realizado históricamente tanto en suero<sup>13,16</sup> como en plasma<sup>13</sup>. Varios autores han intentado aclarar las implicaciones metodológicas de determinar el VEGF en uno u otro medio, su posible equivalencia y la conveniencia de emplear sólo uno de los 2 en el estudio pronóstico de pacientes con neoplasias.

En 1997 Verheul et al<sup>41</sup> determinaron, tanto en plasma como en suero, las concentraciones de VEGF de 42 pacientes con carcinoma de mama durante la administración de quimioterapia. Asimismo realizaron recuentos seriados de plaquetas y los relacionaron con las concentraciones séricas y plasmáticas de VEGF. Llegaron a la conclusión de que las plaquetas son vectores de VEGF y tienen capacidad de secretarlo al medio con distintos estímulos. De esta forma, las concentraciones séricas de VEGF estaban condicionadas por el recuento plaquetario en cada muestra analizada, mientras que las concentraciones plasmáticas de VEGF eran independientes de las plaquetas medidas. Con esta observación propusieron el empleo preferente del plasma como medio de análisis del VEGF en pacientes con cáncer. Sin embargo, unos años más tarde, George et al<sup>42</sup> llevaron a cabo un estudio en 116 pacientes diagnosticados de CCR, en quienes midieron las concentraciones plasmáticas y séricas de VEGF antes y después del tratamiento quirúrgico. Asimismo, compararon los datos observados con los obtenidos en un grupo de igual número de controles sanos. Por una parte, observaron que las concentraciones plasmáticas y séricas de VEGF eran mayores en los pacientes que en los controles y se encontraban relacionadas entre sí tanto en unos como en otros. Además, tanto las concentraciones séricas como las plasmáticas se relacionaron con el recuento de plaquetas y con el estadio de la enfermedad en el grupo de pacientes. Finalmente, propusieron emplear las concentraciones séricas de VEGF, ajustadas por el recuento plaquetario, debido a los valores tan bajos obtenidos al medirlo en plasma, cercanos a los límites de sensibilidad de la técnica de inmunoenanálisis utilizada.

Por último, en 2003 Werther et al<sup>15</sup>, en un estudio en el que incluyeron a 318 pacientes con CCR tratados mediante resección quirúrgica del tumor, midieron 6 meses después de la cirugía los valores séricos y plasmáticos de VEGF y los sé-

ricos de CEA. En el análisis univariante observaron que la combinación de los valores séricos de CEA y VEGF a los 6 meses del tratamiento quirúrgico constituía un mejor índice pronóstico de supervivencia global que la utilización sólo del CEA o de los valores plasmáticos de VEGF. Por esta razón, en la mayoría de los estudios realizados posteriormente<sup>15,43</sup> se ha preferido la determinación de los valores séricos de VEGF a las concentraciones plasmáticas, ajustando estas concentraciones por el recuento de plaquetas.

En la Clínica Universitaria de la Universidad de Navarra se está realizando un estudio en pacientes con CCR en estadio IV para intentar aclarar la utilidad de factores relacionados con la hemostasia y angiogénesis en el pronóstico de pacientes con CCR metastásico. Por el momento se han comunicado algunos resultados preliminares<sup>44,45</sup> que confirman lo observado en otros estudios con respecto al peor pronóstico, en términos de respuesta a la quimioterapia, de los pacientes que presentan concentraciones de VEGF más elevadas antes de recibir el tratamiento citostático<sup>13,40</sup>.

#### Capacidad predictiva y pronóstica del PAI-1 en el cáncer colorrectal metastásico

Durante la activación y migración de las células endoteliales, el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos inducen la expresión de u-PA y su receptor (u-PAR), de t-PA y PAI-1<sup>47,48</sup>. Los activadores del plasminógeno promueven la conversión de esta proteína inactiva en plasmina, que activa los precursores de las metaloproteasas de matriz, con lo que se inicia una cascada de degradación proteolítica<sup>49</sup>. En cuanto a los PAI, en concreto PAI-1, su principal función es la de inhibir la conversión del plasminógeno en plasmina -con lo que la producción de ésta cesa-, la activación de las metaloproteasas de matriz y la liberación o activación de factores de crecimiento latentes. Según estos datos, el PAI-1 debería ser un factor inhibidor de angiogénesis, aunque estudios realizados sobre ratones deficientes en PAI-1 muestran que este inhibidor es necesario para la angiogénesis tumoral, algo que no sucede con ratones deficientes en u-PA, t-PA, u-PA/t-PA o u-PAR<sup>50,51</sup>. Esto apunta a la existencia de múltiples funciones de PAI-1, más allá de su actividad como inhibidor de u-PA<sup>52</sup>. Por ejemplo, su capacidad de proteger y estabilizar la MEC puede ser esencial para la migración endotelial, y no se descarta tampoco una función como modulador de la adhesividad celular<sup>53</sup>.

Recientemente se ha descrito el papel de la expresión tisular del PAI-1 como inductor de expresión de VEGF en células neoplásicas de gliomas humanos<sup>54</sup>. En la actualidad hay discrepancias entre los distintos estudios. Algunos autores encuentran que se favorecen *in vitro* el proceso angiogénico y el crecimiento tumoral, así como el peor pronóstico de los pacientes diagnosticados de distintos tumores, en presencia de expresión tumoral y/o valores plasmáticos elevados de PAI-1<sup>48,50,51,55-58</sup>. Otros, sin embargo, no encuentran relación alguna entre los valores y la expresión tisular de PAI-1 y el desarrollo angiogénico tumoral<sup>59,60</sup>. Por último, se han realizado varios estudios básicos que indican que el PAI-1 podría tener un papel como inhibidor de la cascada angiogénica y de la diseminación tumoral<sup>61,62</sup>.

Se ha intentado dar una explicación a estos datos aparentemente contradictorios. Así, se ha propuesto que el PAI-1, en función de las circunstancias, se podría comportar al mismo tiempo como un estimulador proangiogénico y como un inhibidor de la formación de neovasos<sup>67,68</sup>. Según Dovy et al<sup>62</sup>, que realizaron estudios sobre fragmentos de arterias aorta obtenidas de ratones deficientes en PAI-1, al cultivar los tejidos vasculares en presencia de suero con PAI-1 a con-

centraciones elevadas, se produjo una inhibición del crecimiento de microvasos con respecto a los cultivos con concentraciones fisiológicas de PAI-1, en los que hubo regeneración vascular de los segmentos arteriales dañados. Por su parte, MacMahon et al<sup>68</sup> emplearon implantes de melanoma humano en 3 tipos de modelos murinos. La angiogénesis tumoral en ratones deficientes en PAI-1 se halla disminuida un 60% con respecto a ratones no deficientes, mientras que los ratones con sobreexpresión de PAI-1 presentaron un incremento del proceso angiogénico casi 3 veces mayor que los ratones normales. Al añadir PAI-1 en concentraciones bajas a los implantes tumorales de los ratones no modificados genéticamente, la angiogénesis se triplicó, mientras que las altas concentraciones de PAI-1 lograron inhibir casi por completo el proceso angiogénico tumoral en los implantes de melanoma. Por otro lado, Hakrom et al<sup>69</sup> desarrollaron un método de enzimmunoanálisis con capacidad para medir la fracción activa del PAI-1 además del PAI-1 total. Tras emplear dicha técnica con el plasma de pacientes diagnosticados de melanoma, sólo encontraron diferencias significativas entre pacientes y voluntarios sanos al medir la fracción activa del PAI-1, mientras que la utilización de la concentración total de PAI-1 no mostró diferencias entre controles y pacientes.

Sin embargo, son cada vez más los estudios desarrollados en humanos que apoyan la hipótesis de que tanto la sobreexpresión tumoral de PAI-1<sup>70</sup> como sus valores plasmáticos elevados<sup>12,71,72</sup> confieren un peor pronóstico a los pacientes con CCR, presentando tasas de recidiva más altas y supervivencias globales menores tras la resección quirúrgica. Seetoo et al<sup>70</sup> observaron la correlación entre la sobreexpresión de PAI-1 en el tejido neoplásico colorrectal y la existencia de metástasis hepáticas sincrónicas, pero no hallaron relación alguna con la supervivencia global. Nielsen et al<sup>71,72</sup>, sin embargo, sólo pudieron relacionar los valores preoperatorios más elevados de PAI-1 con un peor pronóstico de los pacientes con CCR localizado al realizar un análisis univariante, puesto que, al incluir en el estudio multivariante el estadio tumoral de Dukes, el sexo, la edad, la localización del tumor, las transfusiones preoperatorias de derivados sanguíneos y los valores de proteína C reactiva, la concentración plasmática del PAI-1 resultó una variable dependiente sin significación pronóstica.

No obstante, apenas hay estudios en pacientes diagnosticados de CCR en quienes se haya comprobado de forma convincente un papel protector de los valores de PAI-1 con respecto a la progresión y muerte<sup>12,73</sup>. Hogdall et al<sup>73</sup> estudiaron en 2002 los valores séricos de tetranectina y CEA, y los plasmáticos de u-PAR y PAI-1 en pacientes con CCR localizado antes de la intervención quirúrgica. Encontraron que los pacientes que mostraban la combinación de menores valores de tetranectina y PAI-1 junto con valores incrementados de CEA y u-PAR soluble tenían un riesgo significativamente incrementado de muerte 2,43 veces superior a los pacientes con valores medios de todos los parámetros medidos. Sier et al<sup>74</sup>, además, observaron que, si bien los pacientes con CCR estudiados presentaban valores tisulares tumorales más elevados de PAI-1 y PAI-2, lo cual determinaba una menor actividad de t-PA en los carcinomas, el incremento tisular de u-PA no se veía afectado por las concentraciones neoplásicas de los inhibidores. Los autores concluyeron que el desequilibrio existente entre los valores tisulares de PAI-1 y PAI-2 con respecto a los de u-PA, a favor de este último, es lo que contribuiría al crecimiento e invasividad mediada por plasmina en estos pacientes.

Hasta el momento, tan sólo en el estudio de la Clínica Universitaria de Navarra<sup>14,45</sup> se han valorado de forma seriada

los títulos plasmáticos de PAI-1 en relación con la quimioterapia en pacientes con CCR metastásico y su posible valor predictivo de progresión de la enfermedad y pronóstico de supervivencia. Las curvas de Kaplan-Meier y el test de rangos logarítmicos de progresión asociada a las concentraciones plasmáticas de PAI-1 confirmaron unos tiempos hasta la progresión significativamente más cortos en los pacientes con CCR metastásico y concentraciones de PAI-1 mayores, tanto antes como después de la quimioterapia.

#### Papel pronóstico de factores relacionados con la hemostasia en el cáncer colorrectal en estadio IV

De forma paralela, en el campo de la hemostasia se han realizado múltiples estudios clínicos transversales de carácter descriptivo que constatan concentraciones sensiblemente superiores del factor Von Willebrand (FwV) en el plasma de pacientes diagnosticados de tumores de mama, próstata, vejiga, cabeza y cuello, ovario, cérvix, laringe y colon, objeto de otras revisiones publicadas hasta la fecha<sup>44,45</sup>.

En dos artículos procedentes del mismo equipo investigador, relativos a las alteraciones de los valores plasmáticos del FwV en los pacientes con CCR<sup>75,77</sup>, no se refleja la evolución de estos valores durante el tratamiento de los pacientes con enfermedad metastásica ni se correlacionan con la supervivencia y la tasa de respuestas al tratamiento. Se limitan, por el contrario, a describir valores superiores del FwV en los pacientes con respecto a los controles sanos, y su relación con un estadio más avanzado del CCR.

La relación de las concentraciones del FwV con la supervivencia global se ha observado más recientemente en pacientes con CCR<sup>78</sup>. Los autores encontraron una asociación significativa entre valores plasmáticos de FwV más elevados y peor pronóstico de los pacientes con CCR metastásico. Sin embargo, estos resultados podrían ser fruto de la falta de un ajuste estadístico por factores de confusión relacionados tanto con los valores plasmáticos del FwV como con la supervivencia de los pacientes, como el recuento de plaquetas, la línea de quimioterapia recibida o la presencia de comorbilidad (diabetes, cardiopatía isquémica, enfermedades del tejido conectivo) en esos pacientes<sup>79</sup>.

En otro estudio llevado a cabo para investigar las alteraciones del sistema de la coagulación y de la fibrinólisis en 40 pacientes con CCR (11 de ellos en estadio IV)<sup>80</sup>, los valores medios de FwV, dímero-D (DD) y fibrinógeno se encontraron significativamente elevados en los pacientes con respecto a los controles. No obstante, tampoco en este caso se analizó de forma prospectiva la evolución de estos parámetros durante el tratamiento, y tampoco se correlacionaron con la respuesta al tratamiento ni con la supervivencia global. Posteriormente varios estudios en pacientes con CCR localizado han encontrado una correlación entre valores prequirúrgicos de DD y hallazgos anatomopatológicos (tamaño, afectación linfática) y estadificación<sup>81,82</sup>; otros autores señalan un papel predictivo y pronóstico de las concentraciones plasmáticas de DD en pacientes oncológicos<sup>82</sup>.

En los últimos meses se ha publicado el primer estudio realizado en pacientes con CCR metastásico previamente no tratados, que investiga la evolución de los valores de DD durante el tratamiento y su relación con la supervivencia global<sup>83</sup>. Los 104 pacientes reclutados recibieron, de forma aleatoria, quimioterapia con 5-fluorouracilo y leucovorín, con o sin el anticuerpo monoclonal anti-VEGF (bavacizumab). Al comenzar el estudio, el 88% de los pacientes tenían valores elevados de DD. Tanto en el estudio univariante como en el multivariante, las concentraciones basales de DD se relacionaron con la supervivencia global, aunque no

presentaron relación directa con el tiempo libre de progresión. Además, el valor basal de DD se relacionó con la carga tumoral y el número de regiones anatómicas metastásicas. Sin embargo, no se describe si los valores de DD tras el tratamiento mostraron una asociación significativa con la progresión o la supervivencia.

En uno de los estudios más recientes sobre este aspecto<sup>44,45</sup>, también se ha analizado de forma seriada los valores plasmáticos de DD y fibrinógeno en relación con la quimioterapia en pacientes con CCR metastásico y su posible valor predictivo de progresión de la enfermedad y pronóstico de supervivencia. En este caso, los valores de fibrinógeno más elevados, tanto previos como durante la quimioterapia, se asociaron a tasas de riesgo de muerte hasta 10 veces superiores. Por su parte, los incrementos de las concentraciones de DD durante el tratamiento se relacionaron con un riesgo de progresión notablemente mayor.

#### Valoración combinada de variables

En los últimos 3 años se ha publicado varios estudios que intentan averiguar si la combinación de los valores de VEGF y CEA puede mejorar el valor pronóstico de cada uno de ellos por separado en pacientes con CCR<sup>37,38</sup>. Los estudios de Broll et al<sup>7</sup> y Werther et al<sup>16</sup> se realizaron con pacientes con CCR resecable, en el primer caso antes del tratamiento quirúrgico, y en el segundo 6 meses después de la intervención. En ambos se observó que la combinación de los 2 marcadores fue útil en la predicción de los hallazgos anatómopatológicos<sup>7</sup> y la supervivencia global<sup>16</sup>.

Tan sólo Berglund et al<sup>17</sup> han buscado la utilidad predictiva y pronóstica del empleo combinado de VEGF y CEA en pacientes con metástasis de CCR en tratamiento con 5-fluorouracilo y leucovorin. Sin embargo, a pesar de observar que los valores de ambos disminuyeron durante el tratamiento, no lograron relacionar estos valores con el riesgo de progresión y la supervivencia global de los pacientes.

En el estudio de la Clínica Universitaria de Navarra, sin embargo, fue la combinación de los valores de VEGF y PAI-1 la que alcanzó la mayor eficacia en el pronóstico de muerte y la predicción de progresión<sup>44,45</sup>.

#### Conclusiones

Sobre la base de la revisión de los datos que se exponen en este trabajo, las concentraciones plasmáticas de FWV, fibrinógeno, PAI-1 y DD podrían actuar como marcadores indirectos de activación del sistema de coagulación en pacientes con CCR diseminado, en el contexto de activación endotelial secundaria a neangiogénesis, tanto en el momento del diagnóstico de la enfermedad como durante los tratamientos posteriores. De igual forma, la concentración sérica de VEGF podría traducir el grado de estimulación angiogénica del tumor durante la evolución de estos pacientes.

Asimismo, se considera que las concentraciones séricas de VEGF y plasmáticas de FWV y PAI-1, tanto en la fase de diagnóstico del CCR como durante los tratamientos antitumorales, podrían ser factores pronósticos de supervivencia y predictivos de respuesta al tratamiento o de progresión de la enfermedad tratada, más específicos y tempranos que el CEA o el CA-19.9, empleados de forma habitual en la valoración y el seguimiento de los pacientes con CCR.

Hay avances continuos y prometedores en el tratamiento del CCR, liderados en los últimos meses por la aprobación de dos nuevos agentes para su uso en pacientes con enfermedad avanzada. Ambos fármacos son anticuerpos mono-

clonales humanizados dirigidos a una diana molecular específica. El cetuximab (autorizado por la Food and Drug Administration estadounidenses desde el 12 de febrero de 2004 para su utilización en primera línea en el CCR metastásico, en combinación con 5-fluorouracilo) es un inhibidor específico del receptor del factor de crecimiento epidérmico<sup>36,35</sup>, mientras que el bevacizumab (autorizado el 27 de febrero de 2004 por la Food and Drug Administration) está dirigido directamente contra el VEGF<sup>36,37</sup> e inhibe el proceso angiogénico de origen tumoral que tiene lugar en el crecimiento y diseminación a distancia de estos tumores.

Estos resultados, y los de los estudios en este campo que en la actualidad se encuentran abiertos, podrían indicar la utilización del VEGF, PAI-1, FWV, DD y fibrinógeno como factores pronóstico en el momento del diagnóstico y predictivos durante el tratamiento y seguimiento de pacientes diagnosticados de CCR metastásico.

Los pacientes cuyas concentraciones de estos factores, como el VEGF, antes del tratamiento antineoplásico sean más elevadas podrían beneficiarse además de peñas de quimioterapia en combinación con nuevos agentes específicos de diana como el bevacizumab. La evidencia existente hasta el momento plantea asimismo la necesidad de llevar a cabo otros estudios en la misma dirección que permitan aclarar la necesidad de administrar estas combinaciones de fármacos de forma adyuvante en pacientes con CCR en estadios tempranos que presenten valores preoperatorios elevados de VEGF.

También el diseño de nuevos estudios que combinen la medición de estas sustancias solubles en series más largas de pacientes, con nuevos rasgos moleculares en el tejido tumoral, contribuirán a la mejor caracterización de su implicación predictiva de progresión y pronóstica de supervivencia.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jemal A, Murray T, Samuels A, Tiwan RC, Ghaibor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:10-30.
- Skibber J, Minsky B, Hoff P. Cancers of the gastrointestinal tract. *Cancer of the colon*. En: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams; 2001. p. 1216-95.
- Martínez-García C, Pens-Bonet R, Sánchez-Pérez M. Epidemiología descriptiva del cáncer en España. En: FESED, editor. *Libro blanco de oncología en España*. Madrid: Ergon; 2002.
- Afende T, García Muñoz JL, Vizoso F, Del Casar JM, Raigoso P, Liana B, et al. Niveles séricos preoperatorios del CEA y pronóstico en el cáncer colorrectal. *Rev Esp Med Nucl*. 2001;20:358-64.
- Berglund A, Mohr D, Larsson A, Einarsson R, Glimelius B. Tumour markers as early predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. *Ann Oncol*. 2002;13:1430-7.
- Bombaki G, Gasbrowaska A, Orszulak-Michalik D, Neneman B, Kotyria J, Strzeszyk J, et al. Elevated plasma gastrin, CEA, and CA 19-9 levels decrease after colorectal cancer resection. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18:148-52.
- Broll R, Eidmann H, Duchrow M, Oesermann E, Schwarzhner O, Markel U, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? *Eur J Surg Oncol*. 2001;27:37-42.
- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*. 2000;88:1739-57.
- Cubo T, Padilla D, De la Osa G, Palomino T, García M, Pardo R, et al. Valores séricos del factor de crecimiento del endotelio vascular en pacientes con cáncer colorrectal y su significación pronóstica. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:201-4.
- De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martelli E, et al. Elevated preoperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer*. 2004;100:270-8.
- Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003;39:718-27.

12. Hagdal CK, Christensen U, Stephens RW, Sorensen S, Norgaard-Pedersen B, Nielsen HJ. Serum telomerase is an independent prognostic marker in colorectal cancer and weakly correlated with plasma suPAR, plasma PAI-1 and serum CEA. *APMIS*. 2002;110:630-8.
13. Hiyata I, Doi T, Endo H, Hosokawa Y, Nishikawa Y, Tanizumi M, et al. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer*. 1998;34:2041-5.
14. Rifer W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Pahi H, et al. Preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 and their prognostic significance in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 1997;17:2935-8.
15. Wn Kleist S, Hesse Y, Karaneseh H. Comparative evaluation of four tumor markers. *CA* 242, CA 199, TPA and CEA in carcinomas of the colon. *Anticancer Res*. 1996;16:2325-31.
16. Werther K, Sorensen S, Christensen U, Nielsen HJ. Circulating vascular endothelial growth factor six months after primary surgery as a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2003;42:837-45.
17. Yuste AL, Acero J, Segura A, López-Tendero P, Giménez R, Pérez-Fidalgo JA, et al. Analysis of clinical prognostic factors for survival and time to progression in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer*. 2003;2:231-4.
18. Kauri M, Pyrhonen S, Ruusela P. Elevated CA19-9 as the most significant prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *J Surg Oncol*. 1992;49:78-82.
19. Hanka B, Riedel C, Lampert S, Happich K, Marus P, Patsch H, et al. CEA and CA 19-9 measurement as a monitoring parameter in metastatic colorectal cancer (CRC) under palliative first-line chemotherapy with weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil (5-FU) and folinic acid (FA). *Ann Oncol*. 2001;12:221-6.
20. Dixon MR, Haskoos JS, Udani SM, Nagh JJ, Arneli TD, Kumar RR, et al. Carcinoembryonic antigen and albumin predict survival in patients with advanced colon and rectal cancer. *Arch Surg*. 2003;138:962-6.
21. Leikens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61:253-70.
22. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267:10931-4.
23. Koch AE. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:951-62.
24. Ferrara N, Ajello K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*. 1999;5:1359-64.
25. Powell J. Update on hemangiomas and vascular malformations. *Curr Opin Pediatr*. 1999;11:457-63.
26. Hanahan D. A flanking attack on cancer. *Nat Med*. 1998;4:13-4.
27. Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs*. 1999;58:17-38.
28. Guba M, Seeliger H, Kleespiele A, Jauch KW, Brunis C. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2004;19:510-7.
29. Kienier DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999;43 Suppl:42-51.
30. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest*. 1999;103:157-8.
31. Senger DR. Vascular endothelial growth factor: vascular permeability factor. Multiple biological activities for promoting angiogenesis. *En: Vlodavets I, D'Amore P, editors. Tumor angiogenesis and microcirculation. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 167-84.*
32. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurczalka T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations *in vitro*. *J Cell Biol*. 1998;140:947-59.
33. Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, Brown LF, Yao KT, Yeo TK, et al. Vascular permeability factor, fibronin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann NY Acad Sci*. 1992;667:101-11.
34. Dross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:201-7.
35. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VEGF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 1996;56:4575-80.
36. Keiser A, Wasch HA, Brandner G, Marne D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*. 1994;9:963-9.
37. Wang Y. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Mol Res Rev*. 2001;21:146-70.
38. Bickhri A, Klein S, Pintucci G, Rifkin B. The roles of proteases in angiogenesis. *En: Bicknell R, Lewis C, Ferrara N, editors. Tumor angiogenesis. Oxford: Oxford University Press; 1997. p. 115-24.*
39. Fujisaki K, Mitsuhashi Y, Toyonaga A, Matsuo K, Tanikawa K. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 1998;93:249-52.
40. Lissoni P, Rowell F, Malugini F, Brivio F, Furnagalli L, Gardani GS. Changes in circulating VEGF levels in relation to clinical response during chemotherapy for metastatic cancer. *Int J Biol Markers*. 2003;18:152-5.
41. Verheul HM, Hoekman K, Luyck-de Bakker S, Eskman CA, Folman CC, Broderman HJ, et al. Platelet transporter of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res*. 1997;3:2187-90.
42. George ML, Eccles SA, Tutton MG, Abulafi AM, Swift RI. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelet count in colorectal cancer: clinical evidence of platelet sequestration? *Clin Cancer Res*. 2000;6:3147-52.
43. Gil-Bazo I, Catalán V, Alonso A, Rodríguez J, Páramo JA, De la Cámara J, et al. Impact of surgery and chemotherapy on von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor levels in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2005;7:150-3.
44. Gil-Bazo I, Rodríguez J, Catalán V, Alonso A, De la Cámara J, Espinós J, et al. Impact of vascular endothelial growth factor (VEGF), D-dimer (DD) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels on clinical outcome in stage IV colorectal cancer (CRC). *Ann Oncol*. 2004;15 Suppl 3:85.
45. Gil-Bazo I, Rodríguez J, Sansteban M, Alonso A, Catalán V, De la Cámara J, et al. Riesgo de progresión y muerte asociados a los valores de factores ligados a angiogénesis, coagulación y fibrinólisis en pacientes con cáncer colorrectal metastático (CCRM) en tratamiento de quimioterapia (QM). *Clin Transl Oncol*. 2005;7 Suppl 1:70.
46. Gil-Bazo I, Rodríguez J, Páramo JA, García-Foncillas J. Angiogenesis and cancer colorectal: papel predictivo y pronóstico del factor de crecimiento del endotelio vascular. *Med Clin (Barc)*. 2004;123:396-7.
47. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*. 1996;49:138-62.
48. Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-induced *in vitro* angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci*. 1997;110(Pt 18):2293-302.
49. Rodríguez Guesada A, Medina Torres MA, Muñoz-Chápuli Oriol R. Angiogenesis. Málaga: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga; 2004.
50. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*. 1998;4:923-8.
51. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Pruss M, et al. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls *in vivo* tumor vascularization by interaction with proteolysis, not vitronectin. Implications for anti-angiogenic strategies. *J Cell Biol*. 2001;152:777-84.
52. Durand MK, Bodker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 and tumor growth, invasion, and metastasis. *Thromb Haemost*. 2004;91:438-49.
53. Rakic JM, Mailard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, et al. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:463-73.
54. Hjortland GO, Uthmanier T, Saemne S, Wang J, Halvorsen T, Just S, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res*. 2004;294:130-9.
55. Baker EA, Looper DJ. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer*. 2003;39:981-8.
56. Berger DH. Plasmin/plasminogen system in colorectal cancer. *World J Surg*. 2002;26:767-71.
57. Montemurro P, Corsetti M, Altomare DF, Memeo V, Colucci M, Semeraro N. Blood and tissue fibrinolytic profiles in patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Lab Res*. 1996;25:195-200.
58. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;181:902-6.
59. Almbolt K, Nielson BS, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Johnsen M. Metastasis of transgenic breast cancer in plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. *Oncogene*. 2003;22:4389-97.
60. Van Gulphoven EM, Lustermaier FA, Van Wersch JW. Evaluation of the coagulation/fibrinolysis balance in patients with colorectal cancer. *Hemostasis*. 1993;23:168-72.
61. Strojani P, Budhina M, Smid L, Vrhovec I, Sirk J. Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and cathepsin D: analysis of their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 2000;20:3975-81.
62. Cayot JF, Bamal J, Bergonzelli GE, Kruthof EK, Medcalf RI, Testar J, et al. Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:6939-43.
63. Garcia D, Schweigener L, Medina MA. Modulation of the proteolytic balance plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor by enhanced N-myc oncogene expression or application of genistein. *Eur J Cancer*. 1998;34:1739-40.
64. Soff GA, Sandstrom J, Gately S, Vernisio E, Weiss I, Brem S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest*. 1995;96:2593-600.
65. Stefanansson S, Pefridien E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem*. 2001;276:8135-41.
66. Stefanansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature*. 1996;383:441-3.

47. Deyl L, Blacher S, Grignel-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J*. 2002;16:147-54.
48. McMahon GA, Petticlerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2001;276:33964-8.
49. Hanekom GS, Shubbings HM, Kidson SH. The active fraction of plasminogen activator inhibitor type 1 as a possible indicator of increased risk for metastatic melanoma. *Cancer Detect Prev*. 2002;26:50-9.
50. Seifor DO, Crowe PJ, Russell PJ, Yang JL. Quantitative expression of protein markers of plasminogen activation system in prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2003;82:184-93.
51. Nielsen HJ, Pappot H, Christensen U, Brunner N, Thorlacius-Ussing O, Moesgaard F, et al. Association between plasma concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and survival in patients with colorectal cancer. *BMJ*. 1998;316:829-30.
52. Nielsen HJ, Christensen U, Sorensen S, Moesgaard F, Brunner N. Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol*. 2003;7:617-21.
53. Ser CF, Vespignani HW, Griffioen G, Verheijen JH, Quax PH, Doosjevaard G, et al. Inhibition of plasminogen activators and their inhibitors in human colorectal neoplasia. Implications of urokinase in colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 1991;101:1522-8.
54. Gil-Bazo I, Catalán V, Páramo J, Queso C, Escrivá DR, Pérez-Díaz A, et al. El factor Von Willebrand como intermediario entre la hemostasia y la angiogenesis de origen tumoral. *Rev Med Univ Navarra*. 2003;47:22-8.
55. Gil-Bazo I, Páramo Fernández JA, García-Foncillas J. Hemostasia, angiogenesis y cáncer: papel del factor Von Willebrand. *Rev Clin Esp*. 2003;203:199-201.
56. Damm DC, Rosko MA, Gus P, Rosenberg I, Bandinelli E, Schwartzman G. Von Willebrand factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2002;17:42-5.
57. Schwartzman G, Damm DC, Rosenberg I. Malignant disease and von Willebrand factor. *Lancet Oncol*. 2001;2:716-7.
58. Wang WS, Lin JK, Lin TC, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, et al. Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005;11:2166-70.
59. Gil-Bazo I, Diaz-Gonzalez JA, Rodriguez J, Cortes J, Calvo E, Páramo JA, et al. The role of von Willebrand factor levels in the progress of stage II colorectal cancer: do we have enough evidence? *World J Gastroenterol*. 2005;11:6072-3.
60. Oya M, Akiyama Y, Yanagida T, Akao S, Ishikawa H. Plasma D-dimer level in patients with colorectal cancer: its role as a tumor marker. *Surg Today*. 1998;28:373-8.
61. Oya M, Akiyama Y, Okuyama T, Ishikawa H. High preoperative plasma D-dimer level is associated with advanced tumor stage and short survival after curative resection in patients with colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2001;31:388-94.
62. Beer JH, Hasbani A, Vogt A, Woodtli K, Henkel E, Furrer T, et al. Coagulation markers predict survival in cancer patients. *Thromb Haemost*. 2002;86:745-9.
63. Blackwell K, Hurwitz H, Lieberman G, Novotny W, Szytko S, Daward M, et al. Circulating D-dimer levels are better predictors of overall survival and disease progression than carcinoembryonic antigen levels in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer*. 2004;101:77-82.
64. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:337-45.
65. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopt J, Mayer R. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004;22:1201-8.
66. Fernando NH, Hurwitz H. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 1:11-8.
67. Verheul HM, Pinedo HM. Vascular endothelial growth factor and its inhibitors. *Drugs Today (Barc)*. 2003;39 Suppl C:81-93.