

# Linfangiogénesis en el cáncer y su papel en la diseminación metastásica

María Dolores Utrera-Barillas,<sup>a\*</sup> Marta Elena Castro-Manreza,<sup>a</sup> Margarita Gutiérrez-Rodríguez<sup>b</sup> y Luis Benítez-Bribiesca<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas y <sup>b</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 30 de julio de 2008

Aceptado: 8 de agosto de 2008

## RESUMEN

Es bien sabido que existen diferentes patrones de metástasis dependiendo del tipo tumoral. Por ejemplo, la diseminación metastásica de los carcinomas es vía linfática preferencialmente, las células neoplásicas llegan a los ganglios linfáticos regionales a través de vasos linfáticos aferentes preexistentes o capilares linfáticos de nueva formación; en cambio, en los sarcomas la vía principal es a través de los vasos sanguíneos. Estos patrones metastásicos han sido utilizados durante muchos años por los clínicos y cirujanos para la etapificación y resección tumoral, particularmente en cáncer de mama. Recientemente este conocimiento ha sido aplicado para la detección y resección del ganglio centinela. El sistema linfático drena el líquido intersticial de los tejidos y lo reincorpora al sistema sanguíneo; además, forma parte de la defensa inmune del huésped y en condiciones patológicas induce diferentes tipos de linfedema y participa en la invasión y metástasis. El estudio de la linfangiogénesis permaneció alejado por muchas décadas y no es sino hasta los últimos años que se han descrito mecanismos biomoleculares y marcadores específicos, los cuales actualmente se están utilizando para estudiar el proceso de diseminación tumoral y metástasis. Existe una tendencia hacia la aplicación clínica de este conocimiento molecular en la clínica para estimar el significado pronóstico de los tumores, así como para desarrollar estrategias terapéuticas específicas.

### Palabras clave:

Linfangiogénesis, cáncer, metástasis

## SUMMARY

It is well-known that there are different tumor-type-dependent metastatic patterns. For example, in carcinomas metastatic spread is preferentially via the lymphatic system by which they reach regional lymph nodes through pre-existent afferent lymph vessels and/or newly formed lymph capillaries; while in sarcomas the favored pathway is through blood vessels. These metastatic patterns have been used for many years by clinicians and surgeons for staging and tumor resection, particularly in the case of breast cancer. Recently this knowledge has been applied to detection and resection of sentinel lymph nodes. The lymphatic system drains the interstitial fluid from tissues and reincorporates it into the blood flow; in addition, it forms part of the host's immune defense and in pathological conditions, induces different types of lymph edema and participates in tumor invasion and metastasis. Although, the study of lymphangiogenesis was stagnated for several decades, it was not until a few years ago that biomolecular mechanisms were discovered and many specific markers are now in use to study the process of tumor dissemination and metastasis. There is a tendency to utilize molecular knowledge in clinical settings for grading and estimating prognostic significance of tumors as well as to develop specific therapeutic strategies.

### Key words:

Lymphangiogenesis, cancer, metastasis

## Introducción

El sistema linfático tiene un papel esencial en el balance oncótico en los vertebrados superiores, quienes poseen un sistema cardiovascular complejo.<sup>1</sup> El oxígeno, los nutrientes y las hormonas son transportados a los tejidos a través de los vasos sanguíneos y capilares. La presión sanguínea a este nivel causa que volúmenes pequeños de plasma pasen continuamente de los capilares al espacio

intersticial. El sistema linfático complementa las funciones del sistema vascular sanguíneo mediante la recolección del líquido intersticial por los capilares linfáticos, para reincorporarlo a la circulación sanguínea a través de los conductos linfáticos colectores. De esta manera, el sistema linfático regula el balance de los líquidos tisulares y facilita el transporte de proteínas intersticiales; además, en el intestino es responsable de la absorción de las grasas en forma de quilo.<sup>2</sup> La linfa en su recorrido a través de estos vasos es filtrada por

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: María Dolores Utrera-Barillas. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, 06725 México D.F., México. Tel. y fax: (55) 2454 6476. Correo electrónico: dolores.utrer@imss.gob.mx

los ganglios linfáticos, donde los linfocitos, macrófagos y células presentadoras de antígenos dan inicio a la respuesta inmune específica.

Las observaciones clínicas y patológicas muestran que la ruta de diseminación de células neoplásicas en tumores sólidos tiene lugar primordialmente a través de los vasos linfáticos hacia los grupos ganglionares de relevo próximo. En el cáncer de mama, por citar un ejemplo, la identificación de metástasis en los ganglios linfáticos axilares es uno de los indicadores pronósticos de mayor relevancia para esta patología.<sup>3,4</sup> Se sabe que una neoplasia es capaz de inducir una red propia de vasos linfáticos que conecta con la red ya existente, siendo la linfangiogénesis un proceso involucrado en la carcinogénesis.

## Antecedentes históricos

En 1627, Gaspar Asellius describió por vez primera los vasos linfáticos del intestino y mesenterio como vasos quilosos,<sup>5</sup> prácticamente al mismo tiempo en que William Harvey describía la circulación sanguínea.<sup>6</sup> Sin embargo, la relación con el cáncer ocurrió con las primeras observaciones, alrededor de 1700, cuando el cirujano LeDran observó que una vez que la masa tumoral invade los ganglios linfáticos regionales de pacientes con cáncer de mama, la sobrevida es menor que cuando la neoplasia está localizada.<sup>6</sup> Por esos años surgió la teoría de la linfa, que suponía que el cáncer se originaba a partir de ella.<sup>7</sup> En 1786, Hunter explicó que los tumores, aunque eran producto de las secreciones linfáticas, eran estructuralmente comparables a la formación de órganos normales.<sup>7</sup> Entre 1829 y 1856 se propusieron algunas teorías sobre la metástasis, entre ellas, la de Récaimer y von Helmsbach-Meckel, en la cual reconocieron que el medio de transporte del cáncer es a través de los vasos linfáticos.<sup>7</sup> Por ello, en 1889 Halsted diseñó la mastectomía radical para pacientes con cáncer de mama, a las que resecaba los ganglios linfáticos axilares.<sup>8</sup> Sus resultados fueron satisfactorios en cuanto a sobrevida, pero las complicaciones, como el linfedema del brazo afectado y la calidad de vida de estas pacientes, hicieron abandonar ese procedimiento.

El estudio funcional de los vasos linfáticos se inició con las descripciones de Starling (1909) sobre las fuerzas intravasculares, hidrostáticas tisulares y oncóticas que gobiernan el intercambio del líquido transcapilar y la formación de la linfa.<sup>9</sup> Starling reconoció claramente que el edema representa un desequilibrio entre la presión intravascular y el tejido. En esa misma época, Sabin aportó información sobre el origen y desarrollo del sistema linfático.<sup>9</sup>

A fines de los años cincuenta surgió la linfografía, que permitió la visualización de los vasos linfáticos y su drenaje en el sujeto vivo. Esta técnica fue usada ampliamente para la localización de metástasis en ganglios regionales de tumores sólidos.<sup>6</sup> Mas adelante, cuando el examen microscópico se usó rutinariamente para el diagnóstico de las neoplasias malignas, fue posible visualizar la invasión de las células malignas a los vasos linfáticos peritumorales que con

frecuencia formaban microtrombos. A este fenómeno se le conoce como permeación linfática y se toma como indicativo de diseminación aunque el cáncer aparezca limitado, por ejemplo, en el cáncer *in situ* del cérvix, de la mama o de la próstata.<sup>3</sup> Si bien la identificación de los vasos linfáticos en estas circunstancias es sencilla por medio de la microscopía óptica, su diferenciación más fina requiere el uso de microscopía electrónica, método complejo y no siempre accesible. Afortunadamente, con el advenimiento de las técnicas modernas biomoleculares ha sido posible encontrar marcadores específicos tanto de vasos sanguíneos como linfáticos.<sup>10-14</sup> Ello ha permitido realizar estudios para definir su papel preciso en el proceso de la carcinogénesis.<sup>10,5-22</sup>

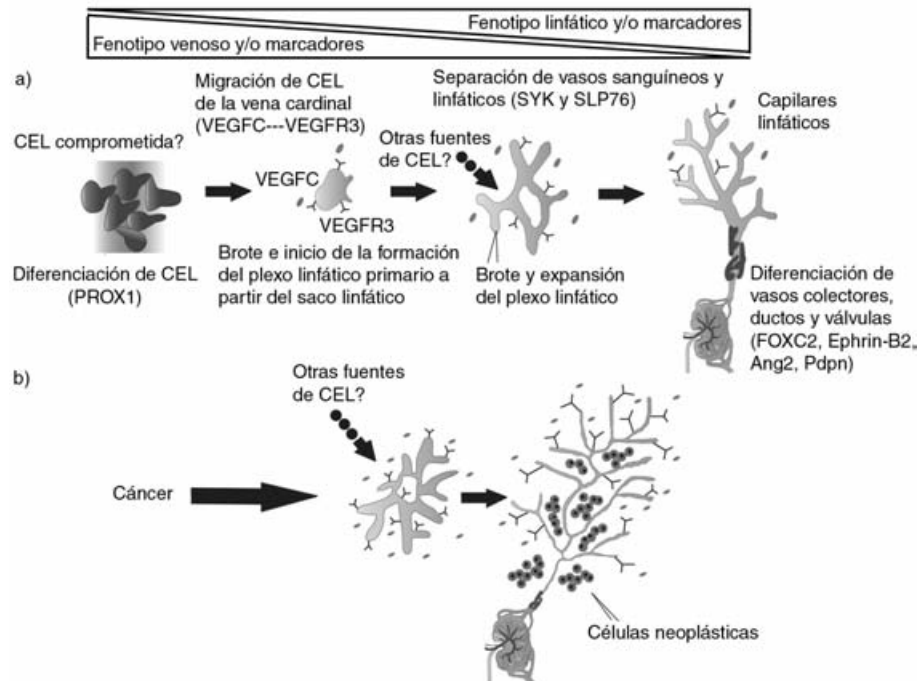
## Desarrollo, estructura y función del sistema linfático

La arquitectura tan compleja de los vertebrados requiere un transporte de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de señalamiento y células circulantes entre los tejidos y órganos, que se lleva a cabo por las dos grandes redes vasculares: los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos, constituidos ambos por células endoteliales. El sistema sanguíneo y el sistema linfático están interconectados a través del conducto torácico y la gran vena linfática, las cuales drenan la linfa a la circulación sanguínea.<sup>19</sup>

Durante la embriogénesis, los hemangioblastos proliferan y se diferencian para formar el plexo capilar, que finalmente da lugar al sistema vascular sanguíneo. Una subpoblación de células endoteliales de la vena embrionaria está comprometida al linaje linfático y a partir de la vena cardinal anterior surge un brote para formar la primera estructura linfática —el saco linfático— a partir del cual se desarrollará la red linfática<sup>18,23</sup> (Figura 1).

Los vasos linfáticos forman una red unidireccional de capilares, tubos precolectores y tubos colectores. Los capilares linfáticos son estructuras tubulares que terminan ciegamente; se localizan dentro del estrato superficial de la dermis, se observan colapsados parcial o totalmente y poseen una luz más ancha e irregular que los capilares sanguíneos. Poseen una membrana basal incompleta, no están recubiertos por pericitos y sus células endoteliales se adhieren a la colágena intersticial por filamentos de anclaje, constituidos de fibras elásticas. El incremento de la presión intersticial causa que las uniones intercelulares se abran, permitiendo el paso de la linfa.<sup>2</sup>

Después de recolectar la linfa, la transportan a los vasos precolectores que se localizan en las capas profundas de la dermis y se caracterizan por válvulas, membrana basal incompleta y células de músculo liso dentro de su estructura. Una vez que entran al tejido subcutáneo, su arquitectura se vuelve más compleja, esto es, incrementa el número de válvulas y de células de músculo liso, su pared es más gruesa y presentan una membrana basal continua. Estos ductos son los llamados “tubos colectores” que transportan la linfa a los ganglios linfáticos. Los conductos aferentes de los ganglios linfáticos se dividen en sinusoides corticales



**Figura 1.** Desarrollo de los vasos linfáticos. a) Las CEL adquieren su fenotipo progresivamente durante la formación de la red linfática. La expresión del factor de transcripción PROX1 define la primera célula endotelial linfática dentro de la vena embrionaria, además de otros marcadores que se van expresando progresivamente (entre ellos LYVE1). Este *switch* al fenotipo linfático es acompañado por una expresión baja de los marcadores sanguíneos (entre ellos CD31 y CD34). El saco linfático continúa bifurcándose con nuevos brotes hasta formar la red linfática. La cinasa de tirosina SYK y la proteína adaptadora SLP76 son necesarias para separar los vasos linfáticos de los sanguíneos. La formación del saco linfático y el proceso de brotes endoteliales conducen a la formación del plexo linfático, el cual se expandirá y remodelará para formar la red linfática constituida de capilares, vasos linfáticos colectores y conductos linfáticos. La unión de VEGFC con VEGFR3 conduce a la traducción de señales en las CEL. El factor de transcripción FOXC2, la glicoproteína Pdpn, el ligando EphrinB2 y la Ang2 están involucrados en la regulación de la diferenciación tardía. b) En el cáncer, entre uno de los varios eventos, se ha descrito un incremento del receptor VEGFR3 y su ligando VEGFC, lo cual se traduce en una linfangiogénesis anormal. Tomado y modificado de Adams y Alitalo.<sup>18</sup>

antes de pasar por debajo de la cápsula del ganglio; la linfa, que es transportada en ellos, pasa a través de un filtro celular retículoendotelial. Los antígenos son procesados por las células presentadoras de antígenos y los epítomos son mostrados a los linfocitos que se encuentran en estos órganos, disparándose la respuesta inmune. La linfa continúa a través de sinusoides medulares a la región hilar del ganglio linfático, para después pasar a los conductos eferentes y finalmente ser vertida a la circulación venosa.<sup>16</sup>

Durante el desarrollo y cicatrización de heridas, la angiogénesis precede generalmente a la linfangiogénesis, implicando la existencia de dos mecanismos distintos espacial y temporalmente coordinados. Aunque las células endoteliales sanguíneas (CES) y las células endoteliales linfáti-

cas (CEL) comparten muchas características, tales como la forma plana, la polaridad basal apical y la expresión de ciertos marcadores endoteliales, sus diferencias en cuanto a funcionalidad y arquitectura requieren una especialización y, por lo tanto, de productos génicos específicos. Se ha reportado que aproximadamente 2% de los genes transcritos son expresados diferencialmente entre las células endoteliales linfáticas y sanguíneas.<sup>24</sup>

Las CEL expresan niveles altos de genes implicados en el metabolismo, secreción y transporte de proteínas. Sobresalen los genes que codifican para proteínas que controlan el transporte y fusión vesicular, entre ellas, miembros de la familia de Syntaxinas, reb GTPasa y ATPasa.<sup>25</sup> Estos resultados sugieren que los vasos linfáticos, además de llevar a

cabo el transporte intercelular, tienen la capacidad para remover selectivamente moléculas del intersticio y así controlar la composición de la linfa y del fluido intersticial.<sup>25</sup>

## Mecanismos moleculares de la linfangiogénesis

El desarrollo vascular del sistema sanguíneo y del sistema linfático es un ejemplo de la fina coordinación entre proliferación, diferenciación, migración, adhesión a la matriz extracelular y señalización, durante la morfogénesis celular. La hemangiogénesis (generación de vasos sanguíneos) está ampliamente estudiada en comparación a la linfangiogénesis (generación de vasos linfáticos). Ambos sistemas comparten varios mecanismos, pero son regulados en forma diferente. Tal es el caso de la familia de genes que codifican para factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factors*) y sus respectivos receptores (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptors*). La respuesta celular a VEGF es regulada por varios mecanismos, entre los cuales están la unión de un ligando a diferentes receptores, grados de afinidad entre los diferentes ligandos de un receptor, la expresión de isoformas, correceptores, estimuladores e inhibidores.<sup>26,27</sup>

La familia VEGF consiste de siete integrantes: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF y factor de crecimiento placentario (PIGF, *placental growth factor*).<sup>27</sup> Todos tienen diferentes propiedades físicas y biológicas y actúan de manera autocrina a través de diferentes receptores con actividad de tirosina cinasa como: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4). Dos miembros de la familia VEGF: VEGFC y VEGFD, son los factores de crecimiento principales en el desarrollo de la linfangiogénesis vía activación de VEGFR3 y en menor grado a través del VEGFR2<sup>18,28,29</sup> (Figura 2).

El VEGFC se sintetiza como una proteína precursora procesada proteolíticamente.<sup>1</sup> En el humano, ambas formas, la total y la madura, se unen a VEGFR3 (receptor principal del señalamiento linfático) con alta afinidad; en cambio, su unión a VEGFR2 depende del grado de procesamiento proteolítico.<sup>1,22,30</sup> La unión VEGFC/VEGFR3 induce mitogénesis, migración y supervivencia de las CEL<sup>15,31-34</sup> (Figura 2). El VEGFC tiene efecto sinérgico sobre VEGFA durante la inducción de la angiogénesis,<sup>16,35</sup> es quimiotáctico para macrófagos y es inducido por citocinas proinflamatorias.<sup>36-40</sup>

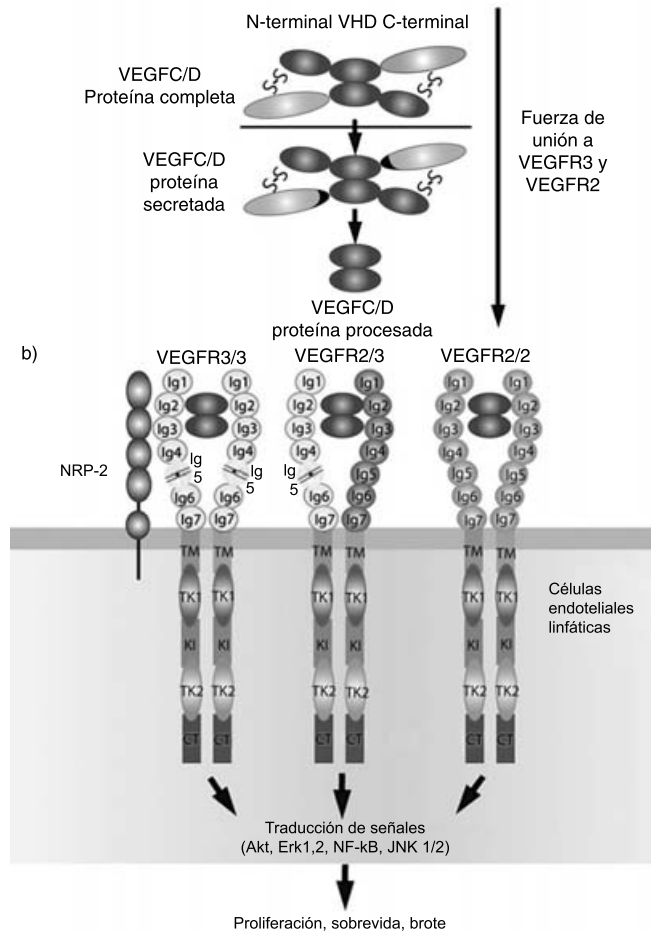
El VEGFD presenta homología estructural de 48% con VEGFC. Se ha observado que durante el desarrollo embrionario, los ratones deficientes en VEGFD presentan un defecto importante de vasos linfáticos.<sup>41</sup> Por otro lado, cuando se administra exógenamente VEGFD a embriones VEGFC -/- se restablece el brote de las CEL.<sup>41</sup> Éstas son algunas de las evidencias que lo sitúan como un factor con potencial linfangiogénico sutil y redundante.

Otras proteínas tales como FGF2 (*fibroblast growth factor-2*), PDGFBB (*platelet derived growth factor-BB*) y HGF (*hepatocyte growth factor*) también estimulan el crecimiento linfático.<sup>42-44</sup>

## Otras moléculas que participan en la regulación de la linfangiogénesis

Entre ellas se encuentran correceptores; factores de transcripción PROX1 (*prospero related homeobox-1*) y FOXC2; las angiopietinas (Angs) y sus receptores Tie; las proteínas podoplanina (Pdpn), SYK, SLP76, EphrinB2 y las metaloproteinasas de matriz (MMP, *matrix metalloproteinases*).

La identificación reciente de correceptores, entre ellos, las neuropilinas (Nrp) y las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 9$  muestran que la vía de señalamiento linfangiogénica es más compleja de lo que se había pensado. Existen dos isoformas de neuropilinas, la Nrp1 y la Nrp2. Nrp1 actúa como un correceptor



**Figura 2.** Vía de señalización VEGFC/VEGFR3 en la regulación del crecimiento de vasos linfáticos. a) VEGFC y VEGFD son activadas por convertasas intracelulares; una proteólisis extracelular posterior genera homodímeros formando la proteína totalmente madura. VHD=dominio homólogo a VEGF (*VEGF homology domain*). b) La unión ligando-receptor conduce a la formación de homodímeros o heterodímeros de los receptores VEGFR2 y VEGFR3 que conlleva a la traducción de señales para que la célula endotelial linfática proliferare, sobreviva y se inicie el proceso de brote. Tomado y modificado de Alitalo y colaboradores.<sup>1</sup>



incrementando la interacción VEGFA-VEGFR2 y Nrp2 participa en la interacción de VEGFC-VEGFR3<sup>19,45-47</sup> (Figura 2).

Respecto a las integrinas, existen estudios en animales de experimentación que demuestran que la integrina  $\alpha 9\beta 1$  se puede unir a VEGFC y VEGFD, su delección origina un fenotipo linfático anormal.<sup>48</sup> En cambio, la integrina  $\beta 1$  al unirse a la fibronectina o colágena, interactúa con VEGFR3 induciendo su capacidad tirosina cinasa.<sup>49</sup>

**Factor de transcripción PROX1.** Se requiere para el programa de diferenciación a vaso linfático. PROX1 mantiene la diferenciación del endotelio linfático en tejido adulto, por lo que es un marcador potencial para el endotelio linfático. PROX1 y VEGFC son esenciales para los procesos de desarrollo iniciales<sup>1</sup> (Figura 1).

**FOXC2.** Factor de transcripción involucrado en definir el fenotipo de los capilares linfáticos *versus* los vasos linfáticos colectores. En los adultos se expresa abundantemente tanto en los vasos linfáticos como en las válvulas linfáticas. El desarrollo temprano de los vasos linfáticos procede normalmente en ausencia de FOXC2, pero en etapas posteriores, el desarrollo de los vasos linfáticos es anormal. Los vasos linfáticos colectores en los ratones FOXC2 -/- pierden las válvulas, mientras los capilares linfáticos adquieren recubrimientos ectópicos de componentes de lámina basal y de células de músculo liso.<sup>22,50,51</sup>

**Angiopoyetinas y receptores Tie.** Se conoce poco de su función sobre la vasculatura linfática. Los receptores de las Angs, Tie1 y Tie2 son expresados en las células endoteliales. Ang1 induce el crecimiento linfático en tejidos adultos.<sup>52</sup>

**Podoplanina.** Originalmente identificada como T1 $\alpha$ /E11 es una sialomucoproteína transmembranal expresada a niveles altos en el endotelio de la mayoría de los vasos linfáticos. Se le sugiere un papel estructural o de unión a quimiocinas.<sup>11</sup>

**SYK y SLP76.** SYK es una cinasa de tirosina y SLP76 es una proteína adaptadora. Están involucradas en controlar la separación de los sistemas vasculares linfático y sanguíneo. Ratones con mutaciones en estas moléculas desarrollan comunicaciones linfático-venosas anormales y desviaciones arteriovenosas.<sup>53-55</sup>

**EphrinB2 y su receptor.** Son reguladores del desarrollo vascular sanguíneo y linfático. La delección de EphrinB2 origina una falta de remodelación del plexo capilar primario y de válvulas.<sup>56</sup>

Otras proteínas importantes en el desarrollo de los sistemas linfático y sanguíneo son algunos miembros de las MMP. Se sabe que activan a citocinas latentes así como a otras MMP y pueden liberar factores de crecimiento unidos a matriz extracelular, tales como VEGFA y FGF, que inducen la linfangiogénesis o angiogénesis, además de degradar proteínas de matriz extracelular que facilitan la invasión endotelial.<sup>57</sup>

## Marcadores del endotelio linfático

Con el descubrimiento de los marcadores linfáticos se está tratando de establecer la importancia diagnóstica de los

vasos linfáticos. Entre las diversas funciones de estos marcadores están los receptores de superficie celular, proteínas transmembranales y factores de transcripción.

El primer marcador descrito para el endotelio linfático fue el VEGFR3. Se expresa sobre el endotelio venoso en el desarrollo temprano, antes del primer brote linfático y es exclusivo del endotelio linfático en el tejido adulto,<sup>10</sup> pero tiene el inconveniente de reexpresarse sobre el endotelio capilar sanguíneo en algunos tejidos tumorales, lo que complica su utilidad como marcador linfático.<sup>58</sup> PROX1 es un marcador que mantiene la diferenciación del endotelio linfático en el tejido adulto.<sup>12,23</sup> Podoplanina es un marcador por excelencia,<sup>11</sup> en su detección se ha utilizado ampliamente el anticuerpo comercial D2-40.<sup>14,59</sup> Sin embargo, tanto PROX1 como podoplanina se encuentran en varios sitios no vasculares, incluyendo epitelios y tejido conjuntivo.<sup>22</sup> El marcador más empleado desde finales de la década de 1990 es la proteína LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1*),<sup>13</sup> es homóloga a CD44 y receptor endotelial para el ácido hialurónico (un mucopolisacárido abundante de matriz extracelular), por ello se considera que está involucrada en el transporte del mismo.<sup>2</sup> En la carcinogénesis probablemente está implicada en la diseminación de células tumorales a los ganglios linfáticos. Existen evidencias que en respuesta a citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$  e IL1 se abate su expresión.<sup>22,60</sup> LYVE1 es un marcador específico de capilares linfáticos en una variedad de tejidos;<sup>13</sup> sin embargo, también se expresa en sinusoides sanguíneos de hígado normal<sup>61</sup> y no se ha detectado en tubos colectores linfáticos.<sup>1</sup> Los ratones LYVE1 -/- no muestran un fenotipo obvio.

Todos los marcadores anteriormente descritos se han empleado en los estudios de linfangiogénesis tumoral; no obstante, es importante resaltar que ninguno es absolutamente específico para identificar los vasos linfáticos, lo que hace necesario probar más de un marcador para su mejor detección y cuantificación. A pesar de ello, estos marcadores han permitido aislar exitosamente CEL de canales linfáticos y a partir de ellas se han podido obtener cultivos primarios.<sup>62</sup> Su selección se realiza utilizando anticuerpos contra podoplanina, VEGFR3 o LYVE1 o por selección negativa mediante anticuerpos contra CD34.<sup>63</sup>

## Linfangiogénesis y cáncer

La detección de la diseminación de las células neoplásicas a los ganglios linfáticos regionales y en particular la del ganglio centinela (definido como el primer ganglio que recibe el drenaje linfático del tumor primario), es un factor central para la etapificación y seguimiento clínico.<sup>64-68</sup> En modelos animales se demostró que el ganglio centinela presenta una reorganización en la vascularización tanto linfática como sanguínea y linfangiogénesis antes de la presencia de células neoplásicas metastásicas.<sup>69</sup> En pacientes con cáncer de mama se ha observado que el incremento de la linfangiogénesis en el ganglio centinela está asociado con metástasis a otros ganglios vecinos.<sup>70,71</sup>

Por ahora no se ha logrado definir si la metástasis es dependiente de la formación e invasión de vasos linfáticos nuevos (linfangiogénesis tumoral), o si es el tumor el que rodea a los vasos linfáticos normales en este proceso de diseminación de los tumores. La linfangiogénesis durante el proceso de carcinogénesis parece ser indicadora de progresión y de mal pronóstico. Existen estudios en cánceres sólidos como el de mama y cérvix, que comprueban la buena correlación clinicopatológica. Además, los estudios en animales han establecido que la inducción artificial de la linfangiogénesis en xenotransplantes de tumores humanos pueden ser suficientes para promover las metástasis a ganglios linfáticos.<sup>72,73</sup>

La información generada hasta el momento puntualiza que tanto la linfangiogénesis como la hemangiogénesis podrían ser útiles como blancos terapéuticos; sin embargo, aunque algunos principios que rigen a la angiogénesis tumoral son aplicables a la linfangiogénesis tumoral, se ha visto que un tumor angiogénico no necesariamente induce linfangiogénesis.<sup>16</sup> En resumen, la linfangiogénesis asociada a una neoplasia es un proceso vascular distinto a la angiogénesis, a pesar de que se inician por estímulos fisiológicos similares.<sup>74</sup>

Se ha demostrado que los factores secretados por las células neoplásicas activan o atraen a las células endoteliales linfáticas, promoviendo la interacción entre ambos tipos celulares, lo que facilita la entrada de las células tumorales a los vasos linfáticos. Diversos trabajos indican que estas interacciones están mediadas por factores de crecimiento,<sup>28</sup> quimiocinas,<sup>75-78</sup> moléculas de la matriz extracelular<sup>79</sup> y moléculas de adhesión.<sup>80</sup>

Los estudios inmunohistoquímicos y de PCR<sup>81</sup> empleados para evaluar marcadores específicos del endotelio linfático, han demostrado ser útiles para predecir metástasis a ganglios linfáticos regionales en varias neoplasias como cáncer de mama,<sup>82-84</sup> colon,<sup>85-87</sup> próstata,<sup>88</sup> vejiga,<sup>89</sup> cérvix,<sup>90,91</sup> tiroides,<sup>92</sup> cáncer oral<sup>93,94</sup> y gástrico.<sup>95</sup> En ellos se ha reportado una correlación directa entre densidad alta de vasos linfáticos (DVL) e invasión linfovascular (ILV) con las metástasis a ganglios linfáticos. Estos resultados difieren a los encontrados por otros investigadores.<sup>96</sup> Las áreas con mayor linfangiogénesis se han observado alrededor de la neoplasia en algunos tumores como cáncer de mama,<sup>97</sup> cervical,<sup>98,99</sup> prostático,<sup>100,101</sup> endometrial<sup>102</sup> y melanoma.<sup>103</sup> Algunos autores sugieren que las células neoplásicas se diseminan a través de los vasos linfáticos preexistentes que proliferan debido a la influencia del microambiente tumoral. Tal parece que los vasos linfáticos intratumorales son disfuncionales debido a la presión generada por las células neoplásicas en proliferación.<sup>97,104</sup> Por el contrario, otros investigadores sugieren que ciertas neoplasias se diseminan a través de vasos linfáticos de neoformación pues encuentran una asociación entre la densidad de vasos linfáticos intratumorales y las metástasis a ganglios linfáticos en carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado,<sup>105</sup> carcinoma de laringe<sup>106</sup> y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.<sup>107</sup>

Varios estudios han demostrado una correlación positiva entre la síntesis de los factores de crecimiento VEGFC o

VEGFD e intravasación,<sup>76,108-110</sup> metástasis a ganglios linfáticos,<sup>41,81</sup> linfangiogénesis,<sup>37,92,108,111</sup> migración celular<sup>14</sup> y peor curso clínico.<sup>85,93,102,112</sup> La sobreexpresión de su receptor VEGFR3 está asociada a una sobrevida menor en cáncer de colon<sup>112</sup> y gástrico,<sup>113</sup> así como una correlación directa con la progresión del cáncer cervical<sup>90</sup> y de próstata.<sup>114</sup> La coexpresión de VEGFC-VEGFR3 también se ha identificado como factor pronóstico en cáncer de pulmón.<sup>115</sup>

Actualmente se acepta que la metástasis está regulada tanto por cambios genéticos y epigenéticos en las células malignas, como por la respuesta de las células estromales del microambiente.<sup>57,116,117</sup> Inicialmente se creía que el infiltrado de leucocitos en el desarrollo de los tumores era un intento del hospedero para erradicar las células malignas. Ciertamente los leucocitos tienen este potencial, pero aún se desconoce bajo qué mecanismos estas células en lugar de apoyar al hospedero favorecen a las células neoplásicas.<sup>116</sup> Las células inflamatorias del sistema inmune innato son la fuente principal de factores de crecimiento y citocinas liberadas al microambiente celular; la exposición crónica a estas moléculas puede inducir la invasión de células neoplásicas, angiogénesis y linfangiogénesis.<sup>116</sup>

Otros grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han encontrado una asociación directa entre DVL y el grado de inflamación<sup>118</sup> (manuscrito en preparación). Entre las citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de VEGFC están IL6, IL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$  y TNF $\alpha$ .<sup>37-40,57,60</sup> Condiciones hipóxicas o la presencia de especies reactivas de oxígeno generadas durante la inflamación inducen la expresión de VEGFA, la cual estimula directamente la linfangiogénesis o indirectamente a través de la síntesis de VEGFC.<sup>57</sup>

Por otra parte, las células neoplásicas también sintetizan factores quimiotácticos para poblaciones específicas de leucocitos, entre ellos, células cebadas, neutrófilos, linfocitos y macrófagos. A los macrófagos que se encuentran cercanos a la neoplasia se les ha denominado "macrófagos asociados al tumor" (MAT). A través de la vía de señalización EGF-EGFR se induce la quimiotaxis de células tumorales o estromales, por una parte, las células estromales son fuente de EGF, entre ellas, los macrófagos y, por la otra, las células neoplásicas poseen el receptor EGFR.<sup>119</sup> Otro mediador inflamatorio estudiado es COX2, el cual induce la expresión de VEGFC en cáncer de mama<sup>120</sup> y gástrico,<sup>121</sup> y como consecuencia linfangiogénesis. En un modelo animal se describió que al inhibir a COX2 se reduce la metástasis a ganglios linfáticos vía reducción de la linfangiogénesis.<sup>122</sup> Nuestro grupo está estudiando la interacción de los MAT y células cebadas con la linfangiogénesis y angiogénesis en el cáncer cervicouterino y ha encontrado asociaciones temporales a través de su evolución (manuscrito en preparación).

Las CEL participan activamente en la formación de metástasis secretando quimiocinas, tales como CCL21 o CCL1, cuyos receptores CCR7 y CCR8, respectivamente, expresan algunas células tumorales.<sup>75,123,124</sup> A CXCR4 y su ligando CCL12 se les ha asociado con metástasis a ganglios linfáticos en cáncer esofágico,<sup>125</sup> de colon<sup>126</sup> y carcinoma hepatocelular.<sup>127</sup>

El incremento de superficie de contacto entre las células tumorales invasoras y el endotelio linfático hiperplásico, el aumento de permeabilidad vascular<sup>16</sup> y la presión baja del líquido linfático,<sup>128</sup> son otros factores que podrían explicar el papel de la linfangiogénesis en el desarrollo del cáncer.

Se han propuesto alternativas para inhibir la linfangiogénesis y en consecuencia las metástasis de tumores sólidos, entre ellas, el empleo de anticuerpos específicos contra VEGFR3,<sup>129,130</sup> contra PIGF $\alpha$ <sup>131</sup> y VEGFA.<sup>132</sup> En líneas celulares y animales de experimentación se ha reportado que la sobreexpresión de endostatina inhibe la metástasis a ganglios linfáticos.<sup>133</sup> Recientemente se silenció el VEGFC con su RNA de interferencia (iRNA) específico y se obtuvo expresión reducida de VEGFC a nivel de proteína y transcrito, e incremento de la quimiosensibilidad a la epirubicina en células de cáncer de mama<sup>134</sup> y de cáncer gástrico.<sup>135</sup>

## Implicaciones clínicas

A partir de estudios clínicos, desde el siglo XIX fue posible deducir el papel que los linfáticos desempeñaban en la diseminación de los cánceres epiteliales, particularmente el de mama. Lo más evidente era la presencia de ganglios linfáticos axilares voluminosos en pacientes con neoplasias malignas de la mama. Esto condujo a Halsted a diseñar la mastectomía radical con vaciamiento axilar; a esta técnica siguieron otras más agresivas que se conocieron como mastectomías suprarradicales. Es cierto que después de esas intervenciones quirúrgicas no mejoró significativamente la sobrevivencia de las enfermas, pero sirvió para constatar que las metástasis a ganglios linfáticos del llamado primer relevo eran muy frecuentes y que su vía de diseminación no era sanguínea sino linfática. Otra neoplasia que ayudó a cimentar la observación de diseminación linfática de cánceres sólidos fue el melanoma de extremidades inferiores, cuyo primario frecuentemente estaba oculto (en la planta o subungueal) y el primer signo aparecía en los ganglios de la ingle aumentados de volumen y endurecidos. En otros cánceres como los de cuello ocurría el mismo fenómeno, ya que en los cánceres laríngeos y tiroideos se encontraban involucrados los ganglios de la cadena yugular. En esos casos también se diseñaron intervenciones quirúrgicas agresivas, como la cirugía radical de cuello.

Con el desarrollo y aplicación rutinaria de la patología quirúrgica, todas las piezas extirpadas fueron disecadas cuidadosamente para extraer los ganglios y estudiarlos microscópicamente. Con estas técnicas fue posible determinar el número, nivel y etapa de afectación ganglionar, dato que los clínicos y cirujanos todavía usan para etapificar la neoplasia.

Con todos estos datos morfológicos, resultaba evidente que la diseminación de esas neoplasias tenía que ocurrir por vía de los vasos linfáticos, aunque también era claro que las metástasis a otros órganos distantes serían por la vía sanguínea. Ya por los años sesenta del siglo pasado surgió la linfangiografía, que permitió localizar ganglios afectados intrapélvicos y paraaórticos (técnica por mucho tiempo olvi-

dada y antecedente de la actual para la búsqueda del ganglio centinela). Ante todos estos datos clínicos y morfológicos se dedujo que la terapéutica lógica era detectar tempranamente los ganglios afectados y researlos en su totalidad, para detener la diseminación subsecuente.

Las intervenciones quirúrgicas eran muy mutilantes y poco efectivas. El estudio microscópico de las neoplasias permitió la observación puntual de los vasos linfáticos dilatados y frecuentemente con émbolos neoplásicos, lo que se conoce como permeación linfática. Pero dado que los vasos linfáticos no siempre están invadidos ni dilatados era difícil cuantificarlos y determinar su localización alrededor del tumor. Éste fue el primer dato microscópico que tuvo correlación con la diseminación neoplásica y con su curso clínico, particularmente en cánceres como el de próstata y mama.

En la época moderna y con el auxilio de las técnicas moleculares, el estudio de la angiogénesis neoplásica cobró importancia desde los estudios pioneros de Folkman. Sorprende que los investigadores se olvidaran del papel de los vasos linfáticos, probablemente porque al no tener contacto con la clínica, ignoraban los antecedentes clinicopatológicos sobre este tema. Fue hasta recientemente que se inició sistemáticamente el estudio de vasos linfáticos por medio de marcadores biomoleculares para tratar de encontrar alguna correlación con la progresión y pronóstico de la neoplasia. Los numerosos factores de crecimiento y sus receptores, así como algunas citocinas que regulan y marcan el crecimiento de los vasos linfáticos ya se describieron ampliamente en la sección anterior, pero su aplicación y significado en la clínica todavía no están claros.

Por medio de técnicas inmunohistoquímicas, usando los marcadores específicos, se ha estudiado la localización de los vasos linfáticos en un intento por entender mejor su participación en la diseminación neoplásica. Todavía no hay consenso del significado de los linfáticos intratumorales y los peritumorales. También se especula si los linfáticos del estroma son inducidos a proliferar por factores de crecimiento secretados por las células malignas.<sup>136</sup> De cualquier manera, los estudios histopatológicos rutinarios ya incluyen la valoración, tanto de la neohemangiogénesis como de la neolinfangiogénesis. En general se considera que el aumento de vasos linfáticos, que no es paralelo al de los sanguíneos, se asocia con mayor actividad neoplásica.

## Perspectivas terapéuticas

Para pensar y diseñar estrategias terapéuticas específicas contra la linfangiogénesis neoplásica, es necesario entender precisamente sus mecanismos biomoleculares. Por el momento persisten muchas interrogantes para las cuales todavía no hay respuestas. Por ejemplo, se precisa conocer cuáles son los efectores de la linfangiogénesis para poderlos inhibir específicamente. Sería lógico pensar que así como se ha probado clínicamente para el caso de la neoangiogénesis (solo parcialmente), la detención del crecimiento de vasos linfáticos podría detener la diseminación de la neoplasia.<sup>137</sup> Sin embargo, hay que recordar que los antiangiogénicos no

tuvieron el resultado esperado y quizá la terapéutica antilinfangiogénesis acarrearía otros problemas dado su papel en la respuesta inmune y en la homeostasis del líquido intersticial. Existiría el peligro de limitar la respuesta inmune y, por otro lado, la interrupción del drenaje linfático acarrearía el aumento de presión intratumoral y con ello limitaría el acceso a drogas oncolíticas por la compresión de los capilares sanguíneos.<sup>138,139</sup>

Es evidente, ante estas interrogantes, que se requiere esclarecer muchos de los aspectos todavía oscuros de la neolinfangiogénesis tumoral antes de intentar una terapéutica antilinfangiogénica. De cualquier manera, es innegable que el estudio biomolecular de la linfangiogénesis ya ha rendido algunos frutos para entender mejor la fisiopatología de la diseminación neoplásica y ha extendido su uso como marcador pronóstico de algunos cánceres.

## Agradecimientos

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, a través de la Coordinación de Investigación Médica en Salud, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 51212-M) por su apoyo económico.

## Referencias

- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;438:946-953.
- Pepper MS, Skobe M. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. *J Cell Biol* 2003;163:209-213.
- Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. Consensus Conference Committee. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast. *Cancer* 2002;94:2542-2551.
- Ito M, Moriya T, Ishida T, Usami S, Kasajima A, Sasano H, et al. Significance of pathological evaluation for lymphatic vessel invasion in invasive breast cancer. *Breast Cancer* 2007;14:381-387.
- Brown P. Lymphatic system: Unlocking the drains. *Nature* 2005;436:456-458.
- Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: Bridging the gaps. *Carcinogenesis* 2006;27:1729-1738.
- Triolo Va. Nineteenth century foundations of cancer research advances in tumor pathology, nomenclature, and theories of oncogenesis. *Cancer Res* 1965;25:75-106.
- Halsted WS. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg* 1894;20:497-555.
- Barcroft H. Review lecture. Bayliss-Stirling Memorial Lecture 1976. Lymph formation by secretion or filtration? *J Physiol* 1976;260:1-20.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3566-3570.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: Podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999;154:385-394.
- Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, et al. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* 2002;21:4593-4599.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;144:789-801.
- Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002;15:434-440.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-1425.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:573-583.
- Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Bréant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002;129:4797-4806.
- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:464-478.
- Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008;3:367-397.
- Stacker SA, Farnsworth RH, Karnezis T, Shayan R, Smith DP, Paavonen K, et al. Molecular pathways for lymphangiogenesis and their role in human disease. *Novartis Found Symp* 2007;281:38-43.
- Benest AV, Harper SJ, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Bates DO. VEGF-C induced angiogenesis preferentially occurs at a distance from lymphangiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;78:315-323.
- Witte MH, Jones K, Wilting J, Dictor M, Selg M, McHale N, et al. Structure function relationships in the lymphatic system and implications for cancer biology. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:159-184.
- Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 2004;4:35-45.
- Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003;162:575-586.
- Podgrabska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16069-16074.
- Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:469-478.
- Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580:2879-2887.
- McCole BK, Stacker SA, Achen MG. Molecular regulation of the VEGF family-inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004;112:463-480.
- Goldman J, Rutkowski JM, Shields JD, Pasquier MC, Cui Y, Schmökel HG, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *FASEB J* 2007;21:1003-1012.
- Wirzenius M, Tammela T, Uutela M, He Y, Odoriso T, Zambruno G, et al. Distinct vascular endothelial growth factor signals for lymphatic vessel enlargement and sprouting. *J Exp Med* 2007;204:1431-1440.
- Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 2002;99:2179-2184.
- Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007;96:541-545.
- Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9:209-223.
- Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001;20:4762-4773.
- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;196:1497-1506.
- Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, Kurozumi M, Manabe T, Wada H, et al. Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2004;91:498-503.
- Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, et al. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery* 2006;139:839-846.
- Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004;113:1040-1050.
- Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest* 2005;115:2363-2372.
- Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:2316-2319.
- Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005;25:2441-2449.
- Matsuo M, Yamada S, Koizumi K, Sakurai H, Saiki I. Tumour-derived fibroblast growth factor-2 exerts lymphangiogenic effects through Akt/mTOR/p70S6kinase pathway in rat lymphatic endothelial cells. *Eur J Cancer* 2007;43:1748-1754.
- Cao Y. Direct role of PDGF-BB in lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cell Cycle* 2005;4:228-230.
- Cao R, Björndahl MA, Gallego MI, Chen S, Religa P, Hansen AJ, et al. Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood* 2006;107:3531-3536.
- Yang H, Li M, Chai H, Yan S, Zhang R, Yao Q, Chen C. Expression and regulation of neuropilins and VEGF receptors by TNF-alpha in human endothelial cells. *J Surg Res* 2004;122:249-255.



46. **Chen C, Li M, Chai H, Yang H, Fisher WE, Yao Q.** Roles of neuropilins in neuronal development, angiogenesis, and cancers. *World J Surg* 2005;29:271-275.
47. **Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, et al.** Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* 2006;20:1462-1472.
48. **Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Sheppard D.** The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin  $\alpha 9\beta 1$ . *J Biol Chem* 2005;280:4544-4552.
49. **Wang JF, Zhang XF, Groopman JE.** Stimulation of beta 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *J Biol Chem* 2001;276:41950-1957.
50. **Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, et al.** Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med* 2004;10:974-981.
51. **Seo S, Fujita H, Nakano A, Kang M, Duarte A, Kume T.** The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev Biol* 2006;294:458-470.
52. **Saharinen P, Kerkelä K, Ekman N, Marron M, Brindle N, Lee GM, et al.** Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J Cell Biol* 2005;169:239-243.
53. **Sebzda E, Hibbard C, Sweeney S, Abtahian F, Bezman N, Clemens G, et al.** Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development. *Dev Cell* 2006;11:349-361.
54. **Kreuger J, Nilsson I, Kerjaschki D, Petrova T, Alitalo K, Claesson-Welsh L.** Early lymph vessel development from embryonic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1073-1078.
55. **Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, et al.** Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 2003;299:247-251.
56. **Mäkinen T, Adams RH, Bailey J, Lu Q, Ziemiecki A, Alitalo K, et al.** PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2005;19:397-410.
57. **Wong SY, Hynes RO.** Tumor-lymphatic interactions in an activated stromal microenvironment. *J Cell Biochem* 2007;101:840-850.
58. **Longatto Filho A, Martins A, Costa SM, Schmitt FC.** VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels. *Pathol Res Pract* 2005;201:93-99.
59. **Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA.** Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol* 2005;18:1490-1497.
60. **Johnson LA, Prevo R, Clasper S, Jackson DG.** Inflammation-induced uptake and degradation of the lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1. *J Biol Chem* 2007;282:33671-33680.
61. **Mouta-Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, et al.** LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 2001;61:8079-8084.
62. **Yong C, Bridenbaugh EA, Zawieja DC, Swartz MA.** Microarray analysis of VEGF-C responsive genes in human lymphatic endothelial cells. *Lymphat Res Biol* 2005;3:183-207.
63. **Garrafa E, Trainini L, Benetti A, Saba E, Fezzardi L, Lorusso B, et al.** Isolation, purification, and heterogeneity of human lymphatic endothelial cells from different tissues. *Lymphology* 2005;38:159-166.
64. **Albertini JJ, Cruse CW, Rapaport D, Wells K, Ross M, DeConti R, et al.** Intraoperative radio-lympho-scintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with melanoma. *Ann Surg* 1996;223:217-224.
65. **Cody HS, Borgen PI, Tan LK.** Redefining prognosis in node-negative breast cancer: can sentinel lymph node biopsy raise the threshold for systemic adjuvant therapy? *Ann Surg Oncol* 2004;11:227S-230S.
66. **Mamounas EP, Brown A, Anderson S, Smith R, Julian T, Miller B, et al.** Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2005;23:2694-2702.
67. **Barroso-Bravo S, Zarco-Espinosa G, Alvarado-Cabrero I, Valenzuela-Flores G, Pichardo-Romero P, Rodríguez-Cuevas S.** Mapeo linfático y linfadenectomía del ganglio centinela para evitar la disección axilar en mujeres con cáncer temprano de mama. *Cir Ciruj* 2005;73:437-441.
68. **Takeuchi H, Kitajima M, Kitagawa Y.** Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Sci* 2008 Mar;99:441-450.
69. **Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, Bruch M, Kort EJ, Ditlev J, et al.** Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:10365-10376.
70. **Van den Eynden GG, Vandenbergh MK, van Dam PJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, et al.** Increased sentinel lymph node lymphangiogenesis is associated with nonsentinel axillary lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel node. *Clin Cancer Res* 2007;13:5391-5397.
71. **Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M.** VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007;109:1010-1017.
72. **Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al.** Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:192-198.
73. **Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al.** Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001;20:672-682.
74. **Eichten A, Hyun WC, Coussens LM.** Distinctive features of angiogenesis and lymphangiogenesis determine their functionality during de novo tumor development. *Cancer Res* 2007;67:5211-5220.
75. **Shields JD, Emmett MS, Dunn DB, Joory KD, Sage LM, Rigby H, et al.** Chemokine-mediated migration of melanoma cells towards lymphatics: a mechanism contributing to metastasis. *Oncogene* 2007;26:2997-3005.
76. **Fukunaga S, Maeda K, Noda E, Inoue T, Wada K, Hirakawa K.** Association between expression of vascular endothelial growth factor C, chemokine receptor CXCR4 and lymph node metastasis in colorectal cancer. *Oncology* 2006;71:204-211.
77. **Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, et al.** Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:2937-2941.
78. **Takanami I.** Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 2003;105:186-189.
79. **Ji RC.** Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol* 2006;4:83-100.
80. **Dua RS, Gui GP, Isacke CM.** Endothelial adhesion molecules in breast cancer invasion into the vascular and lymphatic systems. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:824-832.
81. **Lu Y, Yang Q, Du Y, Feng G, Yang C.** Expression analysis of lymphangiogenic factors in human colorectal cancer with quantitative RT-PCR. *Cancer Invest* 2007;25:393-396.
82. **Bono P, Wasenius VM, Heikkilä P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H.** High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7144-149.
83. **Yu M, Tang Z, Alousi S, Berk RS, Miller F, Kosir MA.** Expression patterns of lymphangiogenic and angiogenic factors in a model of breast ductal carcinoma in situ. *Am J Surg* 2007;194:594-599.
84. **van Iterson V, Leidenius M, von Smitten K, Bono P, Heikkilä P.** VEGF-D in association with VEGFR-3 promotes nodal metastasis in human invasive lobular breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2007;128:759-766.
85. **Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF.** Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2006;19:1317-1323.
86. **Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, et al.** Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007;9:793-800.
87. **Chen W, Shen W, Chen M, Cai G, Liu X.** Study on the relationship between lymphatic vessel density and distal intramural spread of rectal cancer. *Eur Surg Res* 2007;39:332-339.
88. **Brakenhielm E, Burton JB, Johnson M, Chavarría N, Morizono K, Chen I, et al.** Modulating metastasis by a lymphangiogenic switch in prostate cancer. *Int J Cancer* 2007;121:2153-2161.
89. **Zu X, Tang Z, Li Y, Gao N, Ding J, Qi L.** Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis. *BJU Int* 2006;98:1090-1093.
90. **Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N, Thiele W, et al.** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003;201:544-554.
91. **Longatto-Filho A, Pinheiro C, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jubá LF, et al.** Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2007;107:45-51.
92. **de la Torre NG, Buley I, Wass JA, Turner HE.** Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: Relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:931-944.
93. **Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, et al.** Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006;107:563-569.
94. **Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I.** Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2007;110:1287-1294.
95. **Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, et al.** Importance of lymph vessels in gastric cancer: A prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:77-82.
96. **van der Schaft DW, Pauwels P, Hulsmans S, Zimmermann M, van de Pol-Franse LV, Griffioen AW.** Absence of lymphangiogenesis in ductal breast cancer at the primary tumor site. *Cancer Lett* 2007;254:128-136.

97. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2351-2355.
98. Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002;161:947-956.
99. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N, Thiele W, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003;201:544-554.
100. Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(3):392-398.
101. Zeng Y, Opekin K, Horvath LG, Sutherland RL, Williams ED. Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* 2005;65:222-230.
102. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res* 2006;66:3303-3309.
103. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005;18:1232-1242.
104. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002;296:1883-1886.
105. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:716-19.
106. Audet N, Beasley NJ, MacMillan C, Jackson DG, Gullane PJ, Kamel-Reid S. Lymphatic vessel density, nodal metastases, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:1065-1070.
107. Maula SM, Luukka M, Grénman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamäki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003;63:1920-1926.
108. Aishima S, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Taketomi A, Maehara Y, et al. Lymphatic spread is related to VEGF-C expression and D2-40-positive myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:256-264.
109. Ishikawa Y, Aida S, Tamai S, Akasaka Y, Kiguchi H, Akishima-Fukasawa Y, et al. Significance of lymphatic invasion and proliferation on regional lymph node metastasis in renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007;128:198-207.
110. Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama MN, Tilakaratne WM, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol* 2008;61:103-108.
111. Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO. Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res* 2005;65:9789-9798.
112. Witte D, Thomas A, Ali N, Carlson N, Younes M. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:1463-1466.
113. Jüttner S, Wissmann C, Jöns T, Vieth M, Hertel J, Gretschesel S, et al. Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:228-240.
114. Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 2005;65:110-116.
115. Saintigny P, Kambouchner M, Ly M, Gomes N, Sainte-Catherine O, Vassy R, et al. Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in non-small-cell lung cancer: concurrent expression in cancer cells from primary tumour and metastatic lymph node. *Lung Cancer* 2007;58:205-213.
116. Denardo DG, Johansson M, Coussens LM. Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:11-18.
117. Prendergast GC, Jaffee EM. Cancer immunologists and cancer biologists: Why we didn't talk then but need to now. *Cancer Res* 2007;67:3500-3504.
118. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Kawamura T, Hiyama T, Ito M, et al. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007;50:13-21.
119. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006;124:263-266.
120. Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L, et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 2008;8:4.
121. Da MX, Wu XT, Wang J, Guo TK, Zhao ZG, Luo T, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Arch Med Res* 2008;39:92-99.
122. Iwata C, Kano MR, Komuro A, Oka M, Kiyono K, Johansson E, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis. *Cancer Res* 2007;67:10181-10189.
123. Koizumi K, Kozawa Y, Ohashi Y, Nakamura ES, Aozuka Y, Sakurai H, et al. CCL21 promotes the migration and adhesion of highly lymph node metastatic human non-small cell lung cancer Lu-99 in vitro. *Oncol Rep* 2007;17:1511-1516.
124. Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle* 2006;5:812-817.
125. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, et al. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005 Dec;97:1840-1847.
126. Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gönner U, Wilsberg V, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1743-1750.
127. Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Müller A, Frerichs K, Hörner V, et al. Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer* 2006;95:210-217.
128. Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res* 2000;157:55-81.
129. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:819-825.
130. Zehnder-Fjällman AH, Marty C, Halin C, Hohn A, Schibli R, Ballmer-Hofer K, et al. Evaluation of anti-VEGFR-3 specific scFv antibodies as potential therapeutic and diagnostic tools for tumor lymph-angiogenesis. *Oncol Rep* 2007;18:933-941.
131. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PLGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131:463-475.
132. Sundlisaeter E, Dicko A, Sakariassen P, Sondenaa K, Enger P, Bjerkvig R. Lymphangiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic aspects. *Int J Cancer* 2007;121:1401-1409.
133. Brideau G, Mäkinen MJ, Elamaa H, Tu H, Nilsson G, Alitalo K, et al. Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res* 2007;67:11528-11535.
134. Sun P, Gao J, Liu YL, Wei LW, Wu LP, Liu ZY. RNA interference (RNAi)-mediated vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) reduction interferes with lymphangiogenesis and enhances Epirubicin sensitivity of breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2008;308:161-168.
135. He XW, Liu T, Chen YX, Cheng DJ, Li XR, Xiao Y, et al. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer in vivo. *Cancer Gene Ther* 2008;15:193-202.
136. Schoppmann SF, Horvat R, Birner P. Lymphatic vessels and lymphangiogenesis in female cancer: mechanisms, clinical impact and possible implications for anti-lymphangiogenic therapies. *Oncol Rep* 2002;9:455-460.
137. Detmar M. Tumor angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5:20-23.
138. Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res* 1990;50:4478-4484.
139. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.