

## FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA

### El proceso metastásico. I: invasión local de la matriz extracelular\*

**Resumen.**—La capacidad de metastatizar es una de las características esenciales de los tumores malignos. La implantación de una célula o de una colonia metastásica implica indefectiblemente la respuesta combinada de las células tumorales y de las normales y es la consecuencia final de un proceso activo, continuo, complejo y multiescalonado denominado «cascada metastásica», la cual, en síntesis, está constituida por los siguientes pasos: invasión local de la matriz extracelular, penetración de los vasos sanguíneos y/ o linfáticos, diseminación por el torrente circulatorio, detención de las células a nivel de los capilares del órgano diana, extravasación de las células tumorales, infiltración del parénquima circundante, y evasión de las defensas del huésped.

En la primera parte de esta revisión nos ocupamos de los mecanismos mediante los cuales las neoplasias malignas modifican la matriz extracelular: de adhesión, de degradación, y de locomoción. En el primer mecanismo intervienen los factores de adhesividad o glicoproteínas de unión como la laminina o la fibronectina estando mediada esta unión por receptores de las células tumorales como las integrinas; las cadherinas, moléculas de adhesión celular, tienen un efecto inhibitorio en el proceso metastásico. Una serie de proteinasas, principalmente catepsina B, colagenasas intersticiales, y sobre todo el sistema plasmina/ activadores del plasminógeno y la colagenasa tipo IV, parecen estar claramente implicadas en la degradación de la matriz extracelular y ligadas a la capacidad invasiva tumoral. En la motilidad celular individual intervienen, además del imprescindible citoesqueleto, con la emisión de pseudópodos y el movimiento ameboide, la quimiotaxis y los factores autocrinos inductores de la migración, derivados de las propias células tumorales.

**Palabras clave:** Metástasis. Proceso metastásico. Invasión local. Matriz extracelular.

CONCEPCIÓN ROMÁN CURTO  
Cátedra de Dermatología Médico-Quirúrgica y  
Venereología. Facultad de Medicina.  
Universidad de Salamanca. Salamanca.

*Correspondencia:*

Dra. CONCEPCIÓN ROMÁN CURTO. Álava, 1.  
37001 Salamanca.

Aceptado el 17 de junio de 1997.

\* Esta revisión es una parte de la introducción de la Tesis Doctoral *Tumores cutáneos metastásicos. Estudio clínico, histológico y ultraestructural* que obtuvo el premio SmithKline Beecham 1997, a la mejor Tesis Doctoral.

### INTRODUCCIÓN

La capacidad de metastatizar, entendiéndose por ello la posibilidad de producir depósitos tumorales secundarios a distancia del foco primitivo, constituye una de las características esenciales de los tumores malignos (1-3).

En el momento actual, con los avances terapéuticos tanto quirúrgicos como radio, quimio, hormono e in-

munoterápicos, se pueden eliminar la casi totalidad de los tumores sólidos primitivos, quedando por lo tanto el pronóstico de los pacientes condicionado a la existencia o no de metástasis. En consecuencia, la comprensión de todos y cada uno de los mecanismos que intervienen en el proceso metastásico ha adquirido una relevancia inusitada en las últimas décadas y constituye, junto con los estudios de carcinogénesis o genética del cáncer, uno de los pilares fundamentales de

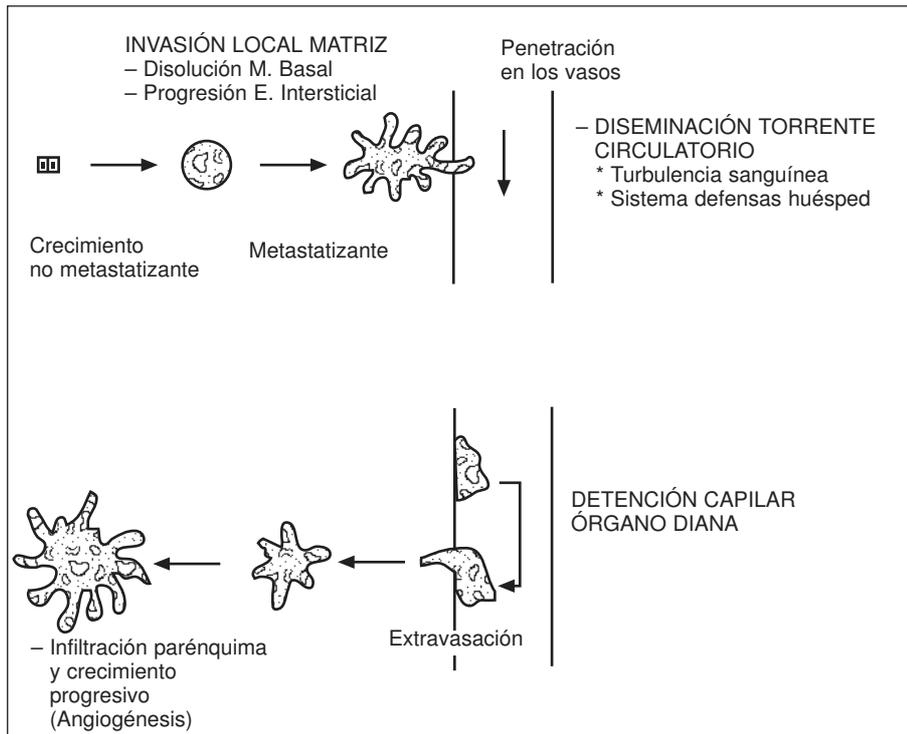


FIG. 1.—Cascada metastásica. Modificado de Schirmacher (1985) (8).

la investigación oncológica, más aún si tenemos en cuenta que entre un 50 y un 60% de los pacientes portadores de neoplasias sólidas (con excepción de las dermatológicas distintas del melanoma) presentan ya metástasis clínicas o subclínicas en el momento del diagnóstico (4-6).

La implantación de una célula o de una colonia metastásica es un fenómeno complicado, que implica indefectiblemente la respuesta combinada de las células tumorales y de las normales, y se considera hoy como la consecuencia final de un proceso activo, continuo, complejo y multi-escalonado denominado «cascada metastásica» (5-10) que, en síntesis, tomando como modelo la vía de diseminación hematogena, está constituido por los siguientes pasos (Fig. 1).

1. *Invasión local de la matriz extracelular*, comprendiendo la disolución de la membrana basal y la progresión a través del estroma intersticial, en la que tienen un papel predominante las enzimas proteolíticas, fundamentalmente las metaloproteinasas (5, 6, 10, 11).

2. *Penetración en los vasos sanguíneos y/o linfáticos* que se realiza mediante la adhesión, en el caso de los capilares sanguíneos, a la membrana basal por receptores específicos de superficie, lisis de aquélla por disolución enzimática y migración celular al interior de los vasos, habitualmente mediante movimientos ameboides (3, 4, 12).

3. *Diseminación de las células tumorales por el torrente circulatorio* donde deberán sobrevivir al sistema defensivo del huésped y al trauma condicionado por la turbulencia sanguínea a la que están sometidas, lo que sólo es conseguido por menos del 0,001% de las células tumorales que se introducen en él (10), fenómeno conocido como *ineficiencia metastásica* (13, 14).

4. *Detención de las células a nivel de los capilares del órgano diana*, mediada por receptores de membrana organoespecíficos existentes en las células tumorales (8) y/ o por factores quimiotácticos derivados del parénquima del órgano a invadir (5).

5. *Extravasación de las células tumorales* mediante un proceso similar, aunque en orden inverso, al utilizado para la penetración en el torrente circulatorio.

6. *Infiltración del parénquima circundante* y progresivo crecimiento de la población metastásica a dicho nivel, para lo cual será necesaria la presencia de factores de crecimiento tanto locales (paracrinos) como autocrinos (segregados por las propias células tumorales), factores hormonales producidos por el huésped y la existencia de una angiogénesis tumoral que asegure el aporte de nutrientes, entre otros (10, 15-18).

7. *Evasión de las defensas del huésped*, mediante resistencia a los macrófagos, células *natural-killer* y linfocitos T activados, junto a un defecto en la expresión o bloqueo de antígenos específicos tumorales y *resisten-*

cia al tratamiento a través de la amplificación de la resistencia genética a las drogas antitumorales (4, 6).

Se postula que todos y cada uno de los pasos son esenciales y que el fallo en cualquiera de ellos determinaría el fracaso de dicho proceso (3); sin embargo, de forma excepcional en ciertos tipos tumorales (fibrosarcomas), algún paso puede ser omitido mientras otros necesitan ser reduplicados (19).

Se comprende que ante tal multiplicidad de variables los distintos grupos de investigadores hayan centrado su trabajo en cada uno de los diferentes pasos. Así, Folkman y su grupo (15, 16, 20-22) han dirigido sus investigaciones hacia la angiogénesis tumoral mejorando ostensiblemente la comprensión de dicho proceso y llegando al descubrimiento de los dos primeros factores antiangiogénicos conocidos: la protamina (23) y la combinación heparina-cortisona (24). Liotta y su equipo (5, 10, 25-28) han centrado su trabajo en el proceso de invasión tumoral estudiando de forma detenida las interacciones entre las células tumorales y la matriz extracelular, con especial énfasis en los mecanismos bioquímicos que acontecen a dicho nivel, además de haber contribuido al descubrimiento y estudio de genes supresores de metástasis como el nm 23 (29-34). Fidler y su grupo han incidido, por una parte, en el papel llevado a cabo por la inmunidad celular en el proceso metastásico (9, 35-39) y, por otra, en un hecho de tanta trascendencia como la *heterogeneidad tumoral*, aportando la primera evidencia experimental de que en las neoplasias malignas existen subpoblaciones celulares con diferente capacidad metastásica (3, 40-46). Schirmmacher y sus colaboradores han centrado su atención en el posible papel que el microambiente tumoral desempeña en la generación de dicha heterogeneidad (8). En el laboratorio de Honn se trabaja en la relación existente entre mecanismos homeostáticos y metástasis, incidiendo de forma especial en el papel jugado por las plaquetas (47-49). Constituyen éstos algunos de los grupos que, junto con otros no menos importantes, trabajan en diferentes campos de la investigación metastásica en un intento de llegar a una perfecta comprensión de tan complejo proceso, lo que a su vez puede permitir la obtención de nuevas alternativas terapéuticas y, con ello, el control de la enfermedad metastásica (8, 50).

Desde hace tiempo se conoce la existencia de patrones metastásicos selectivos, es decir, la tendencia de ciertos tumores, bien definidos histológicamente, a metastatizar preferentemente en un tipo determinado de órgano. Exceptuando la implantación yatrógena, los factores que rigen los otros tipos de diseminación no son todavía bien conocidos. Dos hipótesis emitidas hace tiempo, la de *terreno y semilla*, por Paget en 1889 (51), que considera que el lugar específico de la metástasis

es la consecuencia de la provisión de un medio fértil (el terreno) en el que las células tumorales compatibles (la semilla) pueden proliferar, y la *teoría mecanicista*, enunciada por Ewing en 1920 (52), que afirma que los lugares preferidos para metastatizar se deben únicamente a factores anatómicos y hemodinámicos, se han mantenido durante años cada una con sus respectivos defensores. Las investigaciones actuales en este tema apuntan a que, si bien las metástasis en zonas proximales parecen estar regidas por criterios hemodinámicos, las producidas en órganos muy distantes parecen regirse, entre otros, por receptores de membrana organoespecíficos existentes en las células tumorales (8) y/ o factores quimiotácticos derivados del parénquima del órgano a invadir (5, 53, 54).

## ANÁLISIS DEL PROCESO METASTÁSICO. CASCADA METASTÁSICA

### *Invasión tumoral*

La invasión primaria constituye la etapa inicial del proceso metastásico y consiste en la migración activa de células tumorales desde su lugar de origen, a través de las matrices extracelulares, hasta alcanzar los vasos. La invasión secundaria comprende desde la extravasación de las células tumorales hasta la implantación de un núcleo metastásico (19).

Las *matrices extracelulares*, que separan los diferentes tejidos de los mamíferos, pueden dividirse en dos categorías: *membranas basales* (MBs) y *tejido conectivo intersticial* o *estroma intersticial*. Mientras las MBs poseen una estructura *acelular*, el tejido conectivo intersticial es *celular* y puede ser dividido en varias subclases que, como estroma, hueso, cartílago y tendón, difieren respecto a la función, tipo celular y composición química (72). Las células tumorales atravesarán varias veces las matrices extracelulares durante los diferentes estadios del proceso metastásico; así serán invadidas tanto la MB del órgano de origen, como las MBs subendoteliales en los procesos de intravasación y extravasación tumoral y, en ocasiones, las MBs de nervios, músculos y diferentes estructuras encontradas a su paso. Deberán asimismo penetrar en el estroma intersticial tanto del órgano de origen como del órgano diana, antes de colonizar el parénquima de éste. En los tumores desarrrollados a partir de las células del estroma, como los fibrosarcomas entre otros, se obviará la penetración de la MB del órgano de origen por no poseerla, presentando el mismo comportamiento que el resto de los tumores con relación a la invasión de las otras MBs y del estroma intersticial (5, 6, 10, 11, 27).

## COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS MATRICES EXTRACELULARES

*Membranas basales.* Con esta denominación se conoce a unas estructuras continuas, finas, extracelulares, presentes en casi todo el cuerpo que separan órganos celulares, epitelios y endotelios del tejido conectivo intersticial. Constituyen el sustrato para un crecimiento celular ordenado y son las responsables del mantenimiento de la arquitectura tisular. Tienen una función orientadora para las células proliferantes en los procesos de diferenciación embrionaria y diversos procesos regenerativos como epitelización y reinervación (72).

Los componentes exclusivos y específicos de las MBs son colágeno tipo IV, laminina, entactina y proteoglicano BM1, encontrándose además en ellas elementos que, como fibronectina o colágeno tipo V se hallan en otras estructuras. Una red de colágeno tipo IV forma el esqueleto estructural al que se unen los componentes antes citados. Dicha red es insoluble, distensible e impermeable para proteínas con peso molecular superior a 100 KD y no puede ser penetrada por las células tumorales sin desintegración previa mecánica o química (5).

El *colágeno tipo IV* sintetizado por las células epiteliales y endoteliales es el mayor componente estructural de las MBs, suponiendo un 60% del total de la matriz proteica. En su estructura de triple hélice las secuencias colagenosas están interrumpidas por otras que no lo son, lo que dota de flexibilidad a la molécula, pero a su vez la hacen más susceptible al ataque proteolítico. La adhesión de las células epiteliales a este colágeno, al que se unen de forma preferente, está mediada generalmente por la laminina (55).

La *laminina*, como el anterior, es un componente exclusivo de las MBs producido por las células que descansan en ellas. Supone el mayor componente no colágeno de éstas y se trata de una glicoproteína de alto peso molecular (900-1.000 KD) con forma de cruz asimétrica, en el centro de la cual se une a la superficie celular, mientras que el brazo corto presenta mayor afinidad por el colágeno tipo IV y el largo se une preferentemente a los proteoglicanos. Estimula la adhesión tanto de células epiteliales como endoteliales y está involucrada en los procesos de diferenciación, morfogénesis y migración celular (19).

Los proteoglicanos *heparán* y *condroitín sulfato* han sido identificados en MBs. Son importantes componentes con carga aniónica y contribuyen a la función de filtración macromolecular de éstas.

La *entactina* (Nidogen) es un componente menor, específico de las MBs, que interacciona con la laminina, pero cuya estructura y función no han sido precisadas con exactitud.

Otros componentes como fibronectina y colágeno tipo V también han sido hallados en las MBs. La primera se ha visto en las MBs embrionarias o recientemente formadas.

*Tejido conectivo intersticial.* Consiste en una malla de colágeno y elastina incluida en una sustancia fundamental viscosa y elástica que contiene proteoglicanos y glicoproteínas a cuyo nivel se hallan diferentes tipos celulares según el tejido de origen. Es una especie de andamiaje tridimensional de apoyo que aísla los compartimentos tisulares, posibilita la adhesión intercelular y determina la arquitectura tisular (5). Está presente en diferentes estructuras como hueso, cartílago, fascia, tendones, ligamentos y estroma que difieren tanto en la composición química como en la celular (55).

Las fibras de *colágeno*, que suponen aproximadamente el 90% del material que compone el estroma intersticial, son a su vez las estructuras más características de dicho tejido. Predomina a este nivel el colágeno tipo I que junto con el tipo III se encuentra prácticamente en todas las clases de estroma intersticial excepto en el cartílago donde se encuentra el colágeno II específico de este tejido. Estructuralmente están formados por una triple hélice, al igual que el colágeno tipo IV, pero a diferencia de éste no presentan interrupciones en las secuencias colagenosas lo que los hace rígidos y más resistentes a los enzimas proteolíticos. En menor proporción se encuentran colágenos de los tipos V, VI, VII, VIII, IX y X, algunos de ellos, de forma similar al colágeno tipo IV, presentan secuencias no colagenosas (5, 55).

La *fibronectina*, otro de los principales componentes aunque no exclusivo del estroma intersticial que al igual que la laminina en las MBs juega un papel esencial en la adhesividad celular, es una glicoproteína de 440 KD de peso molecular localizada además de en el estroma intersticial en las MBs y superficie celular y, de forma soluble, en el plasma y otros líquidos corporales. Su importancia en los procesos de adhesividad celular viene dada por su capacidad de unirse a receptores celulares y extracelulares como proteoglicanos y colágenos, jugando además posiblemente un papel importante en la reparación de las heridas y en la homeostasis.

Los *proteoglicanos* y *glucosaminoglicanos* son componentes de la sustancia fundamental, cuya misión principal consiste en el mantenimiento de la forma y volumen del estroma intersticial. Retienen líquidos y, por su carga altamente aniónica, juegan un papel en la permeabilidad y fluido de flujo a dicho nivel. La molécula de proteoglicano está compuesta por una cadena polipeptídica a la que se unen varias cadenas de glucosaminoglicanos. *In vivo* son degradados los proteoglicanos extracelularmente

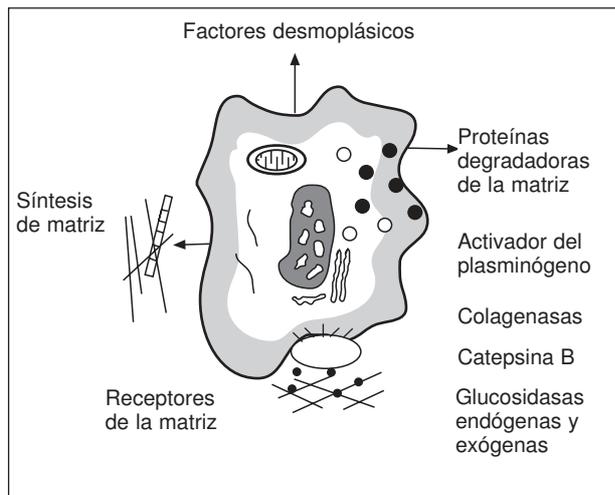


FIG. 2.—Interacciones entre la célula tumoral y la matriz extracelular. Tomado de Liotta (1985) (5).

por proteinasas y, una vez que los glucosaminoglicanos están ubicados intracelularmente, son degradados por los enzimas lisosómicos. La lisis de éstos puede favorecer el movimiento de las células tumorales (72).

La *elastina* es la proteína que esencialmente dota de elasticidad al tejido conectivo. Ampliamente distribuida, constituye el mayor componente de la matriz de los grandes vasos sanguíneos, pulmón y algunos ligamentos. Únicamente es sensible a las elastasas.

Otros componentes del estroma intersticial son la *osteonectina*, proteína de 32 KD, que se encuentra en hueso y dentina, se une al colágeno tipo I y parece jugar un papel en la iniciación de la mineralización y la *condronectina*, glicoproteína con un peso molecular de 180 KD sintetizada por los condrocitos y localizada en cartílago y suero, que promueve la unión de los condrocitos al colágeno tipo II.

Un hecho de importancia en el tema que nos ocupa es que *los componentes de la matriz producidos por una célula reflejan generalmente el tejido de donde proceden*, de lo que se deduce que la identificación de los componentes del estroma intersticial segregados por una célula tumoral diferenciada, pueden ayudar al diagnóstico de las metástasis en el caso de los tumores primarios de origen desconocido (5, 27).

#### FORMAS DE MODIFICACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Los tumores, según Liotta (5), pueden modificar la matriz durante el proceso invasivo de tres maneras diferentes (Fig. 2).

1. Mediante *degradación* de los componentes de la matriz en las zonas de invasión, lo que da lugar a fragmentación y desorientación del estroma y pérdida de la membrana basal (25, 56).

2. Estimulando *acumulaciones* de los elementos de la matriz (desmoplasia), producidos por los fibroblastos o miofibroblastos del huésped, posiblemente como respuesta quimiotáctica a factores elaborados a partir de las propias células tumorales (57).

3. A través de la *síntesis* de los componentes de la matriz por las propias células tumorales, que serán del mismo tipo que los producidos por sus contrapartidas normales, aunque en cantidad muy inferior.

En un tumor puede observarse cualquiera de los tres tipos de matriz modificada e incluso, debido a la heterogeneidad tumoral, los tres en diferentes lugares del mismo tumor.

#### PÉRDIDA DE LA MEMBRANA BASAL EN EL CARCINOMA INVASOR

La pérdida de la membrana basal es un hecho constante y casi definitorio de los carcinomas epiteliales invasivos constituyendo además el primer paso dentro de la compleja etapa de invasión tumoral. La observación de este fenómeno no es ni mucho menos actual, ya Broders en 1932 y Ozello en 1950 lo constatan en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina y PAS respectivamente, según recogen Barsky y cols. (25) en su trabajo. No obstante, su observación mediante tinciones convencionales, como las anteriormente citadas, daba lugar a resultados contradictorios por carecer éstas de especificidad para teñir únicamente glicoproteínas presentes en la membrana basal.

Barsky y cols. (26) utilizaron anticuerpos anticolágeno tipo IV y antilaminina, componentes específicos de la membrana basal, para estudiar las modificaciones de ésta en lesiones benignas, carcinomas *in situ* y carcinomas invasores localizados en mama, piel, páncreas, próstata, colon y útero, mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Con ambas técnicas, en las tumoraciones benignas se apreció la existencia de una membrana basal intacta, revelada mediante una tinción lineal sin interrupciones con ambos anticuerpos, incluyendo lesiones que como la hiperplasia pseudocarcinomatosa cutánea o la adenosis esclerosante de la mama presentan una apariencia muy similar a la de los carcinomas invasores. Pero aún más llamativo es el hecho de que los carcinomas *in situ*, como el comedocarcinoma mamario o la enfermedad de Bowen cutánea, presenten asimismo una

membrana basal intacta de forma similar a la observada en las lesiones benignas en los estudios realizados mediante microscopía óptica y únicamente mediante microscopía electrónica puedan observarse interrupciones en la continuidad de la membrana basal en áreas de microinvasión.

En contrapartida, carcinomas francamente invasores como el carcinoma ductal infiltrante de mama, carcinoma pancreático, carcinoma prostático y otros, carecen por completo de inmunorreactividad frente a dichos anticuerpos, demostrándose así la pérdida completa de membrana basal en este tipo de tumores. En pocos de los carcinomas espinocelulares y adenocarcinomas bien diferenciados estudiados se pudieron observar pequeños focos de tinción positiva, pero incluso a este nivel la membrana basal era generalmente anormal presentando fragmentaciones, discontinuidades e incluso reduplicaciones (5) y jamás presentó una tinción uniforme rodeando el tumor como sucedía en sus contrapartidas benignas.

*Los focos metastásicos por su parte carecían también de inmunorreactividad extracelular frente a los componentes de la MB (25).*

La pérdida de la membrana basal puede ser debida a un descenso de la síntesis, a un ensamblaje disminuido de los componentes secretados, o a un aumento de la destrucción llevada a cabo por las proteasas derivadas del tumor. A favor de esta última explicación estarían, entre otros hechos, el que muchos tipos de células tumorales pueden degradar *in vitro* los componentes de la membrana basal y el que las células de los carcinomas mamarios infiltrantes presentan una intensa inmunorreactividad citoplásmica frente a proteasas degradantes de la membrana basal como la colagenasa tipo IV (5, 26).

Sin embargo, aunque la pérdida de la membrana basal sea un hecho constante en la casi totalidad de los carcinomas invasores, habiendo sido considerada como un marcador o sello de invasión (11), no puede considerarse un signo patognomónico de malignidad, ya que tumores similares al sarcoma sinovial bifásico presentan inmunorreactividad extracelular lineal a colágeno tipo IV y laminina incluso en sus focos metastásicos (25).

## TEORÍA DE LA INVASIÓN EN TRES FASES

Las matrices extracelulares, como ya comentábamos anteriormente, no poseen en condiciones normales vías de paso preexistentes para las células, y fenómenos como la presión de crecimiento o motilidad

celular no bastan, por sí solos, para explicar el proceso invasivo. Existen una serie de mecanismos de tipo bioquímico y celular, puestos en evidencia en los últimos años, que permiten una comprensión más razonada de este primer paso de la cascada metastásica. El grupo de Liotta (5, 6, 10, 27) ha propuesto y venido manteniendo para describir dichos fenómenos una hipótesis de invasión que consta de tres fases: *Adhesión* de la célula tumoral a los componentes de la matriz extracelular; *degradación* local de la matriz por enzimas proteolíticas; y *locomoción* de las células tumorales a través de la matriz modificada.

*Adhesión de las células tumorales a la matriz.* La unión de las células tumorales a la matriz extracelular se lleva a cabo mediante los factores de adhesividad o glicoproteínas de unión que, como la laminina en la membrana basal o la fibronectina principalmente en el espacio intersticial, formarán un puente entre las células neoplásicas y los otros componentes estructurales de la matriz, especialmente los diferentes tipos de colágeno (19, 27, 58). En ausencia de estos factores de adhesividad, la unión de las células tumorales al colágeno se efectúa muy lentamente (58). Dichos factores de adhesividad pueden sintetizarse por las propias células tumorales o bien éstas pueden utilizar factores ya existentes en las matrices extracelulares.

Terranova y cols. (58) observaron que las células con alto potencial *metastásico*, en las que ya previamente se había demostrado una mayor afinidad por el colágeno tipo IV (59), utilizaban *laminina* para adherirse a este tipo de colágeno mientras que las *no metastásicas* utilizaban *fibronectina* para unirse tanto al colágeno tipo I como al tipo IV.

Al aislamiento por parte de Liotta y cols. (27), entre otros, de un receptor específico para la laminina en la superficie celular se sucedió la comprobación, por este mismo grupo, de que las células del carcinoma invasor de mama presentaban en su membrana plasmática una capacidad de unión específica para la laminina 50 veces superior a la de las neoplasias mamarias benignas, obteniéndose una correlación positiva entre la cantidad expuesta de receptores a la laminina y el número de metástasis, avalada además por el hecho de que el bloqueo de estos receptores por ciertos fragmentos de la molécula de laminina inhibe la colonización de los órganos diana (19, 28). Ello puede deberse a que, mientras en las células epiteliales normales los receptores para la laminina están continuamente saturados por descansar sobre una membrana basal, en las células de los carcinomas invasores, que carecen de ella, se incrementará el número de receptores libres a la laminina lo que facilitaría la interacción de estas células con las membranas basa-

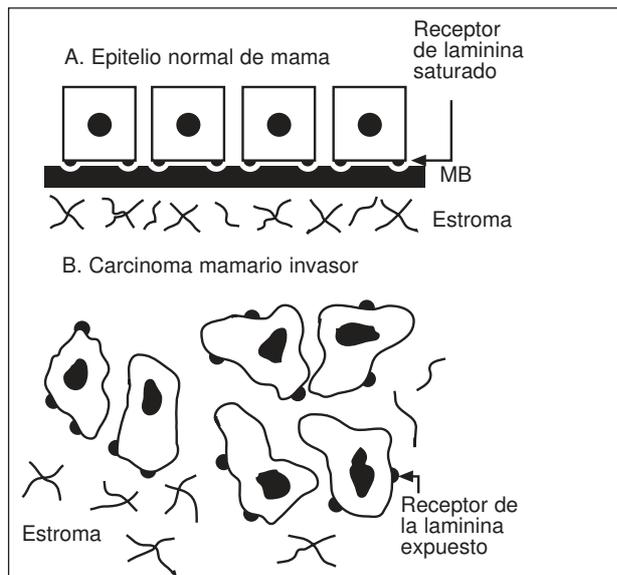


FIG. 3.—Receptores de la laminina en células normales y tumorales. Tomado de Liotta y cols. (1983) (27).

les del huésped durante el proceso metastásico (27). (Fig. 3).

La unión a las glicoproteínas específicas de las matrices extracelulares como fibronectina, colágeno y laminina está mediada por receptores de las células tumorales de las variedades integrina y no integrina.

Las *integrinas* son receptores para las moléculas de adhesión con amplia especificidad y baja afinidad de unión. Se piensa que las moléculas de integrina realizan la unión estructural entre los componentes de la matriz extracelular y el citoesqueleto, por unión a la talina, vinculina y microfilamentos de actina, determinando en gran medida la morfología celular. Evidencias actuales sugieren que hay alteraciones en las propiedades adhesivas de las células tumorales que provocan cambios en estos receptores de adhesión (11). De forma experimental se ha encontrado elevada la expresión del receptor de la vitronectina (alfa-v-beta-3 integrina) en las células de melanoma maligno (60).

Por otro lado, se ha demostrado el efecto inhibitorio de las *cadherinas* (familia de moléculas de adhesión celular con tres subtipos: cadherina-E, cadherina-N y cadherina-P) en el proceso metastásico. Experimentalmente se ha demostrado el efecto antimetastásico de la cadherina-E u ovomorulina en células de riñón canino Madin-Darby y su adquisición de la capacidad invasiva al ser tratadas con anticuerpos anticadherina-E. Por lo tanto la cadherina-E puede actuar como una molécula supresora de la invasión y ser potencialmente un importante agente antimetastásico.

Algunos resultados sugieren que la capacidad aumentada de las células tumorales para unirse tanto a otras células tumorales como a las células del huésped inhibe la habilidad de éstas para escapar del tumor primitivo e iniciar la invasión; sin embargo, y contradictoriamente, estudios sobre la función de los receptores de la fibronectina, vitronectina y laminina indican que la inhibición de la adhesión de las células tumorales da lugar a un comportamiento invasivo menos agresivo (11). Es posible que la habilidad para invadir requiera una *expresión intermedia de la capacidad de adhesión*, ya que células con muy escasa capacidad adhesiva serán incapaces de unirse al sustrato e invadir, mientras que en el otro extremo, células extremadamente adherentes no podrán desprenderse y migrar desde el tumor primitivo. Por lo tanto los mecanismos de control específicos de adhesión celular y motilidad deberán acoplarse para producir el fenotipo invasivo (11).

*Degradación de la matriz por enzimas proteolíticos.* Una vez lograda la adhesión a los diferentes componentes de las matrices extracelulares, las células tumorales deberán abrirse paso a través de éstas mediante un proceso de disolución enzimática. Este proceso, que incluirá además la destrucción de las glicoproteínas de unión, si bien no implica necesariamente la ruptura de las matrices extracelulares, sí debe al menos reducir la organización molecular y disminuir la resistencia física del tejido. Ello se realiza a través de enzimas proteolíticos que son liberados al medio o se localizan tanto en la superficie de las células tumorales como de las normales vecinas. Dicha disolución enzimática tendrá lugar en zonas próximas a las células tumorales donde la cantidad de enzimas proteolíticos supera a la acción de los inhibidores proteolíticos existentes de forma habitual en la matriz (19). Una definición de «orden social» de la célula tumoral metastásica es su tendencia a disgregar las barreras de la matriz extracelular y entremezclarse con células de variedades diferentes a las existentes en el lecho del tumor original (10).

En la destrucción de las matrices extracelulares intervienen varios enzimas proteolíticos o proteinasas, que pueden agruparse en cuatro clases diferentes dependiendo de su lugar catalítico, pH óptimo de actuación, requerimientos catiónicos y susceptibilidad a los inhibidores. Las proteinasas asociadas con mayor frecuencia al fenotipo maligno son: *activadores del plasminógeno, colagenasas, proteoglicanasas y catepsinas*. Unas, como la plasmina y las catepsinas, tienen amplia especificidad de sustrato mientras otras, como las colagenasas, son altamente específicas. Algunas, además de realizar su acción de forma directa, intervienen en

fenómenos de cascada activando proenzimas, como ocurre con la plasmina que activa la procólagenasa a colagenasa. Aunque pueden ejercer su actividad por separado, su eficacia aumenta cuando actúan conjuntamente al igual que sucede con la cascada proteolítica de la coagulación sanguínea (11).

Los *activadores del plasminógeno* son unas serino-proteasas que convierten el plasminógeno en plasmina. Existen dos tipos mayores de activadores del plasminógeno: el activador del plasminógeno tipo tisular (AP-t) y el activador del plasminógeno similar a la urocinasa (AP-u). Este último ha sido identificado *in vivo* en células similares a los fibroblastos y es segregado por la mayoría de los carcinomas mientras el AP-t, segregado por el resto, se localiza en el endotelio vascular de muchos tejidos. Si bien el AP-u por sí solo no puede destruir directamente componentes de las matrices extracelulares, sí puede hacerlo indirectamente mediante la generación de plasmina que, además de degradar la fibrina, lisa las glicoproteínas de unión. A su vez la plasmina, como ya comentábamos previamente, puede activar las colagenasas latentes que degradan el colágeno fibrilar o el colágeno de las membranas basales.

Los activadores del plasminógeno se hallan aumentados en células y tejidos malignos en general, pero no se ha podido establecer una correlación directa entre transformación maligna y producción de activadores del plasminógeno no pudiendo ser usados como medida del potencial metastásico de las células tumorales a pesar de que se ha demostrado en estudios experimentales que anticuerpos contra los AP pueden prevenir la formación de metástasis (55).

Las *catepsinas* son unas proteinasas lisosómicas que han podido ser cuantificadas en los líquidos intersticiales tumorales. Los niveles de éstas, sobre todo de catepsina B, se han correlacionado con el potencial metastásico *in vivo* de líneas celulares de melanoma, entre otros tumores (5). Dicha enzima puede contribuir a la destrucción de diversos componentes de la matriz, mediante la internalización y degradación lisosómica de fragmentos de macromoléculas generados por las hidrolasas fuera de la célula. Estudios *in vitro* muestran que la catepsina B puede degradar colágeno tipo I, laminina y proteoglicanos, pudiendo también activar colagenasas intersticiales latentes presentando por tanto un patrón de degradación de las matrices extracelulares similar al propuesto para el sistema AP/ plasmina (55).

Las *proteoglicanasas* ejercen su acción mediante la lisis de los proteoglicanos, componentes básicos de la sustancia fundamental de las matrices extracelulares, lo que favorece el movimiento de las células tumora-

les entre las fibras de colágeno, además de contribuir a la exposición de las redes de colágeno a la acción de las colagenasas.

La degradación bioquímica de los proteoglicanos requiere dos tipos de enzimas: *glucosidasas*, que rompen las cadenas laterales de los glucosaminoglicanos, y *proteinasas*, que degradan el centro y proteínas de anclaje.

Un componente importante de las membranas basales lo constituyen los proteoglicanos con heparán sulfato; se ha identificado una *heparanasa* tumoral que se halla más aumentada en las células con alto potencial metastásico que en las de baja capacidad invasiva. La heparanasa tumoral parece jugar un papel en la remodelación de las membranas basales y su destrucción durante la invasión tumoral.

Proteinasas no específicas, como *catepsina B*, *estromelisinina*, *elastasa*, *tripsina* y *catepsinas D y G*, pueden degradar la porción proteica de los proteoglicanos (5, 55).

Las *colagenasas* son unas metaloproteinasas cuya misión altamente específica consiste en la degradación de las fibras de colágeno que, debido a su estructura, se muestran resistentes al ataque de los otros tipos de proteasas. Éstas pueden dividirse de modo genérico en dos grandes grupos: colagenasas intersticiales y colagenasas específicas de las membranas basales.

Las *colagenasas intersticiales*, caracterizadas a partir de tejidos tumorales que degradan el colágeno de los tipos I, II, III y X, son semejantes a la clásica colagenasa intersticial de los diversos animales vertebrados, descubierta por Gross en las colas de renacuajo cuando se reabsorbían. Ambos tipos de colagenasas presentan la misma gama de pesos moleculares—desde 33 hasta 80 y 71 KD respectivamente—, su actividad depende del calcio y del zinc, son inhibidas por quelantes metálicos y antiproteinasas séricas, funcionan a pH neutro y escinden la molécula de colágeno a 25° C, dando lugar a dos fragmentos con un tamaño que mide 3/4 partes y 1/4 parte de los originales (55). Estas colagenasas son secretadas como proenzimas y pueden ser activadas por diferentes proteinasas como tripsina, quimotripsina, proteinasas de los mastocitos, plasmina, kaliceína y catepsina B, además de por algunas proteinasas neutras endógenas, seroproteinasas e incluso químicamente, por mercuriales orgánicos.

Las colagenasas intersticiales tumorales presentan muchas similitudes con las producidas por los tejidos normales, hasta el punto de reaccionar con los anticuerpos anticólagenasa producida por la sinovia reumatoidea no tumoral (61).

Aunque el nivel de colagenasas tumorales intersticiales se ha asociado con la agresividad de carcinomas

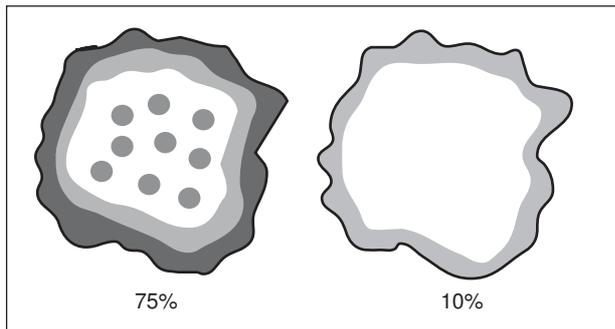


FIG. 4.—Producción de colagenasa tipo IV por las células tumorales.

orales y de vejiga urinaria humanos, no ha podido establecerse una relación directa entre aquéllas y el potencial metastásico (5, 55).

Las *colagenasas específicas de las membranas basales*, es decir aquellas que degradan los colágenos de los tipos IV y V, resistentes a las colagenasas intersticiales y especialmente la colagenasa tipo IV, han suscitado un enorme interés en la investigación de las metástasis, por haberse hallado altos niveles de actividad colagenolítica tipo IV en muchos tumores metastásicos.

La *colagenasa tipo IV (gelatinasa)* es una metaloproteínasa cuyo peso molecular oscila entre 60 y 70 KD, existe en forma latente y presenta una susceptibilidad a los inhibidores y unas propiedades fisicoquímicas similares a las de las colagenasas intersticiales, produciendo a 25° C una escisión simple en la molécula de colágeno IV, en una región situada a la cuarta parte de la distancia que existe a partir de uno de los extremos de la molécula. La colagenasa tipo V presenta un peso molecular de 80 KD y degrada de forma específica el colágeno tipo V.

La capacidad de producir colagenasa tipo IV no es privativa de las células metastásicas o tumorales; se ha comprobado que células normales en condiciones especiales, como fibroblastos proliferantes y células embrionarias, pueden presentar esta actividad colagenolítica pudiendo intervenir en la metabolización de las membranas basales durante la remodelación normal de los tejidos. Sin embargo con técnicas de transfección de ADN y/o hibridación celular somática se ha logrado introducir el fenotipo metastásico en las células receptoras. Se observó que la adquisición de la capacidad metastásica se correlacionaba con la producción de colagenasa tipo IV lo que supondría que la expresión de esta enzima sería una de las propiedades celulares genéticamente ligadas a la expresión del fenotipo metastásico (19). Esta teoría estaría apoyada por estudios *in vivo* como el de Barsky y cols. (26) quienes, mediante técnicas inmunocitoquímicas con PAP, demuestran actividad colagenolítica tipo IV en las áreas infiltrantes de todos los tumores mamarios malignos sin poder objetivarla en ninguna de las lesiones

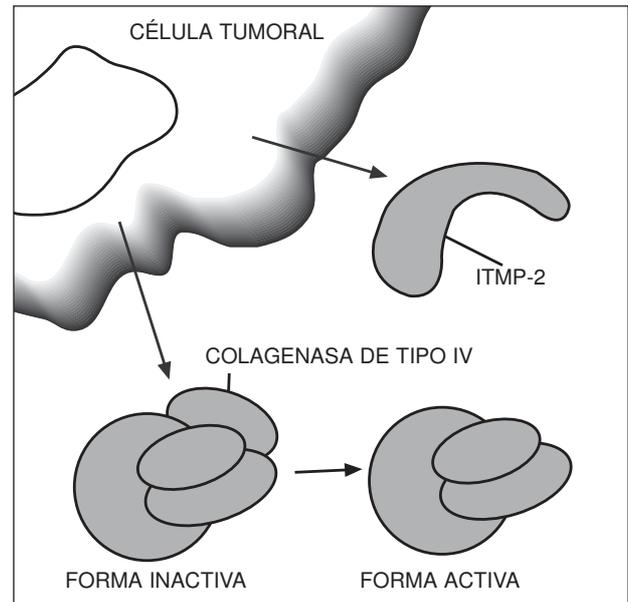


FIG. 5.—Activación de la colagenasa tipo IV al desprenderse el inhibidor que lleva incorporado. Tomado de Liotta (1992) (10).

benignas ni en áreas no invasoras de las lesiones malignas. El porcentaje de células tumorales que presentaba inmunorreactividad fue muy variable de unos tumores a otros, oscilando entre un 10 y un 75%, localizándose las células positivas, cuando eran escasas, en la periferia del frente de invasión (Fig. 4). Si ello puede ser explicado mediante la heterogeneidad tumoral, debido a la cual sólo algunas células tendrán capacidad para producir dichas enzimas o porque las células *in vivo* puedan conectar o desconectar su capacidad para producir colagenasas, es algo que todavía está por dilucidar.

Otro punto discutido es el de origen celular de las colagenasas, que parece indudable a partir de las células tumorales, existiendo, no obstante, datos que apoyan su procedencia también a partir de células del huésped como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y mastocitos, que podrían ser estimuladas por factores segregados por las propias células tumorales (véase Liotta (5)).

Todas las metaloproteinasas se sintetizan como formas inactivas, debido a la presencia de una secuencia de nueve aminoácidos «muy conservada» situada en uno de los extremos de la molécula que contiene un resto muy activo correspondiente al aminoácido cisteína. En la forma inactiva, el extremo de la molécula se encuentra plegado y la cisteína interacciona con el ión metálico alojado en el centro activo de la enzima bloqueándolo. La metaloproteínasa se activa cuando el péptido que contiene la cisteína se desprende del centro activo (Fig. 5).

Las metaloproteinasas se producen, por lo tanto, con sus propios inhibidores incorporados. Desde el

punto de vista terapéutico, una opción muy atractiva sería la de que un fármaco capaz de imitar al péptido que lleva la cisteína bloquease la actividad de la metaloproteínasa deteniendo o inhibiendo la invasión (10).

Otras proteinasas, sobre las que no vamos a entrar en detalles, como *estromelisin*, *gelatinasa*, *metaloproteínasa ácida*, y *elastasa*, intervienen degradando diferentes componentes de las matrices extracelulares. Tan sólo comentar que la expresión de la estromelina-3 está asociada con la progresión de tumores mamarios y otra estromelina, la matrilina, con la de los gástricos y carcinomas de colon (11).

Los inhibidores de las proteinasas existentes en el suero y/o en las matrices extracelulares, elaborados tanto por las células normales como por las propias células tumorales, como alfa<sub>2</sub> macroglobulina, beta<sub>1</sub> anticolagenasa, proteína C reactiva e inhibidores tumorales de las metaloproteinasas (ITMP) entre otros, tienden a frenar la capacidad invasora tumoral. La presencia de los ITMP locales producidos en tejidos normales podría explicar la resistencia que algunos tejidos, como el cartílago, presentan a la invasión tumoral.

Se conocen al menos dos variedades de los ITMP: ITMP-1 e ITMP-2; y aunque ambos son capaces de inhibir todas las metaloproteinasas, el tipo 2 presenta una afinidad especial por la forma inactiva de la colagenasa tipo IV. Son segregados también por las células tumorales dándose la circunstancia de que la misma célula que sintetiza una metaloproteínasa podría producir un inhibidor de ella. Los ITMP se comportan por lo tanto como proteínas supresoras de metástasis pudiendo el ITMP-2 bloquear además la neoangiogénesis. De ello se deduce que fármacos con su mismo tipo de acción podrían también constituir un tratamiento efectivo para evitar la invasión (10).

Sean cuales fueren las enzimas que intervienen en cada momento, lo cierto es que la degradación proteolítica de las matrices extracelulares *in vivo* está controlada por mecanismos de activación/inhibición de las proteinasas, existiendo en las neoplasias un incremento neto de la actividad de éstas lo que conlleva a un catabolismo aumentado de las matrices extracelulares que favorece la invasión tumoral.

Catepsina B, colagenasas intersticiales y, sobre todo, sistema plasmina/ activadores del plasminógeno y colagenasa tipo IV parecen estar claramente ligadas a la capacidad invasiva tumoral.

*Locomoción celular hacia la matriz modificada.* La motilidad celular individual juega un papel importante dentro del proceso invasivo, hasta el punto de que estudios experimentales han demostrado que la inhibición de la movilidad celular, desestructurando su cito-

esqueleto, puede en algunos casos, aunque no en todos, prevenir la invasión (3). Se ha demostrado una motilidad aumentada en las células tumorales que se halla directamente relacionada con su capacidad invasiva; pero experimentalmente también se ha observado en cultivos de células malignas seleccionadas por su gran capacidad de migración (células hipermóviles) que, junto a su carácter hiperinvasivo de los tejidos adyacentes, existía un descenso de su potencial para producir metástasis espontáneas. Estos hechos sugieren que subpoblaciones celulares excesivamente eficientes en un paso del proceso metastásico, debido a su sobreespecialización, pueden estar empobrecidas para superar otros pasos de dicho proceso (62).

Este último paso dentro del proceso invasivo parece iniciarse con la pérdida de la adhesión intercelular, mediante disociación enzimática de las uniones intercelulares en las que jugarían un papel esencial las proteinasas asociadas a la superficie celular. Dicha disociación facilitaría la movilidad celular individual y contribuiría a la liberación de células individuales o grupos celulares desde los tumores sólidos. La locomoción celular se produce mediante un proceso secuencial de uniones y separaciones de áreas localizadas de la superficie celular al sustrato. Parece que la adhesión está mediada por fibronectina y heparán sulfato mientras que para la ulterior separación son necesarios condroitín sulfato e hialuronato, siendo especialmente importante la concentración de este último en la matriz para inducir la migración. Ha sido observado precediendo a la migración un aumento de glicosaminoglicanos, fundamentalmente hialuronato, en la matriz extracelular (8).

La *migración direccional* de las células tumorales en respuesta a los gradientes de concentración de factores solubles existentes en la matriz extracelular se conoce como *quimiotaxis*, mientras que cuando dicha migración se efectúa en respuesta a las proteínas insolubles de la matriz extracelular, en ausencia de factores solubles, se conoce como *haptotaxis*. Parece ser que en etapas iniciales del proceso metastásico tiene mayor relevancia la migración haptotáctica, mientras que más tarde las células responden de forma preferente a estímulos quimiotácticos (11).

La protrusión de pseudópodos es un hecho prominente en la motilidad celular activa induciendo el factor de motilidad autocrina la rápida formación de éstos. Dichos pseudópodos presentan un alto contenido en receptores para laminina y fibronectina. Entre sus múltiples funciones se encuentran el poder actuar como órganos sensitivos interaccionando con las proteínas de la matriz extracelular señalando de esta manera la dirección de la migración, traccionar para

la locomoción, e inducir proteólisis local de la matriz ayudando de esta forma a su penetración (6).

En resumen las células tumorales, esencialmente mediante un movimiento ameboide, emitiendo pseudópodos, en los que tienen lugar las interacciones célula-sustrato (55), migran a través de las matrices extracelulares modificadas respondiendo fundamentalmente a *estímulos quimiotácticos*, como los factores dispersantes (*scatter factors*) derivados del hésped, factores de crecimiento, hialuronato, y factores derivados de las glicoproteínas de la matriz de los órganos diana (fibronectina, laminina), y a *factores autocrinos inductores de la migración* que se hallan representados por citocinas inductoras de la motilidad derivadas de las células tumorales como el factor de motilidad autocrina y la autotaxina (63, 64).

**Abstract.**—One of the main features of malignant neoplasms is their metastatic power. The implant of either a cell or a metastatic colony involves the combined response of tumoral and normal cells, and is the final consequence of a complex, active, continued and multistep process named «metastatic fall». Its major steps are: Local invasion of the extracellular matrix, penetration into blood and/or lymph vessels, dissemination through the blood stream, arrest of neoplastic cells within the capillaries of the target organ, extravasation of neoplastic cells, and evasion of the host defenses.

In the first part of this article, we review the mechanisms by which malignant neoplasms modify extracellular matrix: Adhesion, degradation, and motion. In the first mechanism, adhesion factors, or union glycoproteins, such as laminin and fibronectin, are involved; the union is mediated by receptors of the neoplastic cells, as integrins; cadherins, a type of cell adhesion molecules, have an inhibitory effect of the metastatic process. A series of proteinases, mainly cathepsin B, interstitial collagenases, and chiefly plasmin/ plasminogen activator system and type IV collagenase, seem to be directly involved in extracellular matrix degradation and tumoral invasion capacity. Cytoskeleton, with pseudopod formation and ameboid motion, chemotaxis, and migration inductor autocrine factors, produced by neoplastic cells themselves, are involved in individual cell motility.

Román Curto C. *On the metastatic process. I: the local invasion of extracellular matrix. Actas Dermosifiliogr* 1999;90:143-155.

**Key words:** Metastasis. Metastatic process. Local invasion. Extracellular matrix.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rosen T. Cutaneous metastases. *Med Clin North Am* 1980;64:885-900.
2. Bonadonna G, Molinari R. Tipos de diseminación de los tumores. En: Bonadonna G, Robustelli Della Cuna G (eds.). *Manual de oncología médica*. Barcelona: Editorial Masson, S. A.; 1983. p. 19-25.
3. Fidler IJ, Hart IR. Principios de la biología del cáncer: biología de las metástasis. En: *Cáncer: principios y práctica de oncología*. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg S. A. (eds.). Barcelona: Salvat Editores, S. A.; 1984. p. 76-88.
4. Sugarbaker EV, Weingrad DN, Roseman JM. Mechanism of metastasis formation. En: Pilch YH (ed.). *Surgical Oncology*. Nueva York: Editorial McGraw-Hill Book Company; 1984. p. 198-230.
5. Liotta LA. Mecanismos de la invasión cancerosa y las metástasis. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Avances de oncología*. Barcelona: Editorial Espaxs, S. A.; 1985. p. 49-65.
6. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer metastasis. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Cancer: Principles and practice of oncology*. Filadelfia: Lippincott Co.; 1993. p. 134-49.
7. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1979;283:139-46.
8. Schirmacher V. Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts and impacts for treatment strategies. En: Klein G, Weinhouse S (eds.). *Advances in cancer research*. Vol. 43. Orlando: Academic Press; 1985. p. 1-73.
9. Fidler IJ. Host and tumor factors in cancer metastasis. *Eur J Clin Invest* 1990;20:481-6.
10. Liotta LA. Invasión de células cancerosas y metástasis. *Investigación y Ciencia* (abril), 1992;24-32.
11. Aznavoorian S, Murthy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects for tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993;71:1368-83.
12. Warren BA, Chauvin WJ, Philips J. Blood-borne tumor emboli and their adherence to vessel walls. En: Day SB (ed.). *Cancer invasion and metastasis: biologic mechanisms and therapy*. Nueva York: Raven Press; 1977. p. 185-97.
13. Weiss L. Cancer cell traffic from the lungs to the liver: an example of metastatic inefficiency. *Int J Cancer* 1980;25:385-9.
14. Weiss L. Metastatic inefficiency: causes and consequences. *Cancer Rev* 1986;3:1-9.
15. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature* 1980;288:551-6.
16. Folkman J. Angiogénesis y sus inhibidores. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Avances en oncología*. Barcelona: Editorial Espaxs S. A.; 1985. p. 67-90.
17. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985;313:747-51.
18. Mendelsohn J, Lippman ME. Principles of molecular cell biology of cancer: growth factors. En: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Cancer: principles and prac-*

- tice of oncology. Editorial J.B. Filadelfia: Lippincott Co.; 1993. p. 114-33.
19. Puricelli LI, Gómez DE, De Kier Joffe EB. Análisis del proceso metastásico. *Medicina (Buenos Aires)*, 1987;47:313-6.
  20. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275-88.
  21. Folkman J. Antiangiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;179:409-16.
  22. Folkman J. What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23:361-3.
  23. Taylor S, Folkman J. Protamina is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 1982;297:307-12.
  24. Folkman J, Langer R, Linhart RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983;221:719-25.
  25. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 1983;49:140-7.
  26. Barsky SH, Togo S, Garbisa S, Liotta LA. Type IV collagenase immunoreactivity in invasive breast carcinoma. *Lancet* 1983;8319:296-7.
  27. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983;49:636-49.
  28. Barsky SH, Rao CN, Williams JE, Liotta LA. Domains of laminin which alter metastasis in a murine model. *J Clin Invest* 1984;74:843-50.
  29. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Lobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200-4.
  30. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989;49:5185-90.
  31. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IMK, King CR, Liotta LA, Steeg PS. Reduced Nm23. Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 1989;342:177-80.
  32. Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A *drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 1990;63:933-40.
  33. Marx J. New clue to cancer metastasis found. *Science* 1990;249:482-3.
  34. Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IMK, Liotta LA, Steeg PS. Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm-23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991;65:25-35.
  35. Fidler IJ. Immune stimulation-inhibition of experimental cancer metastasis. *Cancer Res* 1974a;34:491-8.
  36. Fidler IJ. Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. *Cancer Res* 1974b;34:1074-8.
  37. Fidler IJ, Gersten DM, Budmen MB. Characterization *in vivo* and *in vitro* of tumor cells selected for resistance to syngenic lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1976;36:3160-5.
  38. Fidler IJ, Bucana C. Mechanism of tumor cell resistance to lysis by syngenic lymphocytes. *Cancer Res* 1977;37:3945-56.
  39. Fidler IJ, Gersten DM, Kripke ML. Influence of immune status on the metastasis of three murine fibrosarcomas of different immunogenicities. *Cancer Res* 1979;39:3816-21.
  40. Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature* 1973;242:148-9.
  41. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977;197:893-5.
  42. Fidler IJ. Tumor heterogeneity on the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651-60.
  43. Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982;217:998-1003.
  44. Fidler IJ. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry* 1989;10:673-80.
  45. Fidler IJ. The biology of cancer metastasis or, «you cannot fix it if you do not know how it works». *BioEssays* 1991a;13:551-4.
  46. Fidler IJ. Cancer metastasis. *Br Med Bull* 1991b;47:157-77.
  47. Honn KV, Cicone B, Skoff A. Prostacyclin: a potent anti-metastatic agent. *Science* 1981;212:1270-2.
  48. Honn KV, Cavanaugh P, Evens C, Taylor JD, Sloane BF. Tumor cell-platelet aggregation: induced by cathepsin B-like proteinase and inhibited by prostacyclin. *Science* 1982;217:540-2.
  49. Honn KV, Steinert BW, Onoda JM, Sloane BF. The role of platelets in metastasis. *Biorheology* 1987;24:127-34.
  50. Weinstein-Saslow D, Steeg P. Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *Faseb J* 1994;8:401-7.
  51. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;1:571-3.
  52. Ewing J. A treatise on tumors. 3rd edition. Philadelphia: Saunders; 1920.
  53. Pauli BU, Augustin-Voss HG, El-Sabbau ME, Johnson RC, Hammer DA. Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:175-89.
  54. Menter DG, Cavanaugh PG, Nicolson GL. Adhesion and growth properties of metastatic tumor cells that colonize specific organ sites. En: Robes H, Peters PE, Munk K (eds.). *Metastasis: basic research and its clinical applications. Contrib Oncol. Vol. 44.* Basilea: Karger; 1992. p. 60-94.
  55. Tryggvason K, Höyhtyä M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 1987;907:191-217.
  56. Albrechtsen R, Nielsen M, Wewer U, Engvall E, Ruoslahti E. Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Res* 1981;41:5076-81.
  57. Iozzo RV, Bolender RP, Wight TN. Proteoglycan changes in the intercellular matrix of human colon carcinoma. An integrated biochemical and stereologic analysis. *Lab Invest* 1982;47:124-38.

58. Terranova VP, Liotta LA, Russo RG, Martín RG. Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. *Cancer Res* 1982;42:2265-9.
59. Murray JC, Stingl GS, Kleinman HK, Martin GR, Katz SI. Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *J Cell Biol* 1979;80:197-202.
60. Gehlsen KR, Davis GE, Sriramarao P. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clin Exp Metastasis* 1992;10:111-20.
61. Woolley DE, Tetlow LC, Mooney CJ, Evanson JM. Human collagenase and its extracellular inhibitors in relation to tumor invasiveness. En: Strand P, Barret AJ, Baiei A (eds.). *Proteinases and tumor invasion*. Nueva York: Editorial Raven Press; 1980. p. 97-134.
62. Grimstad IA. Growth and metastasis of hypermotile, hyperinvasive cancer cells selected *in vitro* by rapid locomotion under various conditions. *Clin Exp Metastasis* 1988;6:257-69.
63. Liotta LA, Madler R, Murano G. Tumor cell autocrine factor. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:3302-5.
64. Starkey JR. Cell-matrix interactions during tumor invasion. *Cancer Metast Rev* 1990;9:113-23.