

ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DA PROGRESSÃO TUMORAL

Cellular and Molecular Aspects of Tumor Progression

ROGER CHAMMAS¹ LUISA LINA VILLA²

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, a partir do qual uma célula normal passa a adquirir progressivamente características de imortalização, capacidade de gerar tumores, e finalmente capacidade de invadir tecidos normais e colonizar órgãos à distância.

Neste artigo, são revistas as principais fases da progressão tumoral a nível molecular. Nesta abordagem, baseiam-se as atuais estratégias de definição de fatores diagnósticos, prognósticos e, por vezes, terapêuticos a serem usados em Oncologia nos próximos anos. Demos ênfase a alguns aspectos que estão sendo estudados em nosso meio, com possível aplicação clínica.

Unitermos: Progressão Tumoral - aspecto celular
Progressão Tumoral - aspecto molecular

Keywords: Tumor Progression - Cellular aspects
Tumor Progression - molecular aspects

1 - Junior researcher, biology molecular

2 - Senior researcher, virology

Introdução

Muito do que se sabe hoje sobre as bases moleculares e celulares do câncer resulta de estudos envolvendo vírus causadores de tumores.

Desde os anos 50, verificou-se que alguns vírus, quando colocados em contato com células em cultura, em vez de provocar efeitos citopáticos clássicos, causavam o aparecimento de áreas de células empilhadas e morfológicamente alteradas. Tal comportamento não era inteiramente inesperado, porque no fim dos anos 30, mostrou-se que os vírus do sarcoma de galinha podiam provocar mudanças comparáveis em explantes de órgãos e na membrana corioalantóica dos ovos. Essa transformação das células em cultura de tecidos causadas pelos vírus pode ser vista como a contrapartida "in vitro" dos processos pelos quais os vírus causam tumores no animal. A relevância desses achados para o estudo de tumores no ser humano é apoiada pela provável etiologia viral de alguns cânceres humanos e pela descoberta de protooncogenes ativadas em tumores não associados a vírus.

Endereço para correspondência: Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - Rua Professor Antonio Prudente, 109
CEP 01509-900 - São Paulo-SP

Os estudos de transformação celular envolvendo vírus oncogênicos formaram o conceito de que o câncer é uma doença genética, envolvendo mudanças discretas do genoma celular, podendo ser mutações pontuais, inserções ou deleções em um número pequeno de genes, transmitidas de célula para célula (6). Os genes capazes de causar transformação celular são chamados oncogenes e foram originalmente encontrados em vírus de RNA (ou retrovírus) (5, 57). Estes genes são derivados de genes celulares; portanto, os homólogos dos oncogenes virais foram designados protooncogenes ou oncogenes celulares. Os oncogenes encontrados em vírus de DNA, por outro lado, são genuinamente genes virais, que para causar transformação devem ser transferidos do vírus para a célula. Um outro grupo de genes com funções de controle de crescimento e multiplicação celular deve ser considerado nos processos neoplásicos: são os genes supressores de tumores, genes celulares cuja alteração por mutação ou ligação de seus produtos protéicos a oncoproteínas virais também leva à transformação maligna.

O trabalho efetuado com os vírus causadores de tumores emprega entre outras metodologias a cultura de tecidos para estudar o comportamento de células normais e neoplásicas. A sua aplicação no estudo das neoplasias é vista com alguma reserva devido à dificuldade de reproduzir em cultura todas as respostas humorais, celulares e de localização que poderiam influenciar a evolução do tumor no organismo como um todo. Por outro lado, algumas células se adaptam prontamente à cultura e o ambiente artificial do recipiente poderia provocar a seleção de características celulares que tem pouca importância no hospedeiro. Estas considerações provocaram a realização de muitos estudos para identificar as características de transformação "in vitro" que se correlacionam mais precisamente com a habilidade de formar um tumor no animal.

Características gerais da transformação celular

A transformação celular é uma alteração genética, irreversível em condições normais, afetando vários aspectos do crescimento celular.

Os estudos genéticos realizados com vírus causadores de tumores permitiram a identificação de oncogenes e a elucidação de suas funções, apoiando a noção de que as características observadas nas células transformadas "in vitro" encontram correlato nos processos tumorigênicos "in vivo". Além disso, os efeitos causados por esses agentes podem ser observados após horas ou dias, o que é separável dos eventos tardios que podem ocorrer no animal, meses ou anos de progressão do tumor. As principais alterações ou

propriedades da célula transformada (revisado em 4) são enumeradas a seguir:

1) Perda da capacidade de regular seu crescimento. Quando células normais são semeadas em plástico ou vidro, ligam-se à superfície do recipiente, espalham-se, deslocam-se e dividem-se até que a proximidade entre as células limite a continuação do crescimento, um efeito conhecido como densidade de saturação celular. Isto pode ser facilmente observado pela formação de uma monocamada de células que pára de se dividir enquanto não se fizer a expansão para uma superfície maior. As células transformadas podem atingir densidades de saturação muito maiores, com consequente formação de pilhas celulares, significando a perda do controle de crescimento. Esse tipo de ensaio é frequentemente usado para testar a ação de oncogenes transfectados em células animais e humanas, pois a formação de "focos" de células transformadas é facilmente detectado na superfície do recipiente onde as células estão sendo cultivadas.

2) Menor necessidade de fatores de crescimento para proliferar. Para manter células em cultura, empregam-se meios líquidos contendo todos os nutrientes e fatores necessários à sua proliferação, o que se consegue frequentemente pela adição de soro fetal bovino. Este contém, além de uma série de proteínas necessárias à ligação e espalhamento das células, hormônios, vitaminas e íons, mitógenos peptídicos como o fator de crescimento da epiderme (EGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e hormônios como insulina (50). A ligação destes fatores a receptores específicos presentes na superfície das células desencadeia uma cascata de eventos que leva à indução da síntese de DNA e divisão da célula. Deste processo participam alguns protooncogenes celulares como *myc*, *jun* e *fos* que são ativados transcricionalmente (revisado em 45), e a indução rápida e precoce destes genes resulta finalmente na divisão celular. Por outro lado, a maioria das células transformadas pode continuar se dividindo em baixas concentrações ou mesmo na ausência dos mitógenos mencionados.

Isto se deve ao fato que muitas delas são capazes de produzir seus próprios fatores de crescimento, significando frequentemente a expressão contínua dos protooncogenes acima relacionados. A propriedade que exibem as células transformadas de prescindir parcialmente de soro para crescer pode também residir na alteração de genes que codificam para os receptores celulares onde atuam os fatores de crescimento (17).

3) Diminuição da dependência, para crescer, de adesão ao substrato. Enquanto células normais só crescem se aderirem à superfície plástica ou de vidro do recipiente em que estão sendo cultivadas, algumas células transformadas po-

dem fazê-lo em suspensão.

Isso é conseguido semeando as células em meios de cultura adicionados de agar suficiente para deixá-los semi-sólidos. Nestas condições, as células normais continuam viáveis mas não se dividem, enquanto as transformadas podem formar colônias em suspensão. Os mecanismos que explicam esse fenômeno não são conhecidos, mas é possível que a produção autócrina de TGF possa estimular a síntese de colágeno e fibronectina em quantidades suficientes para suportar o crescimento em suspensão das células transformadas (4, 41) (vide adiante).

4) *Mudanças morfológicas e estruturais, envolvendo o citoesqueleto, a superfície celular e a matriz extracelular.*

Células transformadas por vírus apresentam frequentemente alterações de forma e mobilidade em diferentes graus. É comum observar-se rearranjo de microfilamentos no interior da célula transformada, envolvendo a desorganização dos feixes de actina, o que em geral provoca um arredondamento e pior adesão dessas células ao substrato. Uma outra modificação importante envolve a permeabilidade celular a íons e transporte de nutrientes: a velocidade de absorção de açúcares e aminoácidos pode ser até dez vezes maior nas células transformadas quando comparada às normais. Além disso, mudanças estruturais nas glicoproteínas da superfície de células transformadas por vírus ou derivadas de tumores, tornam-as mais suscetíveis à aglutinação por lectinas (44). Este aspecto, associado a mudanças na síntese de proteínas da matriz extracelular e de seus receptores celulares, é discutido mais adiante, pela sua importância no processo metastático.

A multiplicidade de ações dos oncogenes virais

Os estudos realizados com vírus causadores de tumores permitiram definir a pleiade de efeitos causados por suas oncoproteínas. Para definir os eventos moleculares que levam à transformação celular, foi fundamental a identificação de vários oncogenes virais, a descoberta do homólogo celular e a determinação de sua função. Assim, oncoproteínas de membrana ou citoplasmáticas foram relacionadas a componentes da cadeia celular de transdução de sinal; por outro lado, as oncoproteínas de localização nuclear participariam da regulação da síntese e transcrição do DNA celular. Isto posto, podemos exemplificar os principais mecanismos de ação dos oncogenes no controle de crescimento e diferenciação celulares da seguinte forma:

O sinal mitótico é exercido pela interação de uma molécula solúvel, um fator de crescimento por exemplo, a um receptor específico presente na membrana da célula (o

oncogene *sis* é homólogo do gene para PDGF; *erbB* e *fms* codificam para formas alteradas do receptor de EGF); segue-se a transdução do sinal através da forforilação de proteínas por quinases citoplasmáticas ou associadas a membranas (nesta categoria incluem-se as proteínas codificadas pelos oncogenes *mos*, *ras*, *fps*, *ras*, entre outros); finalmente, o controle de transcrição gênica mediada por fatores de transcrição nucleares (entre as oncoproteínas nucleares, destacam-se *jun*, *fos*, *myb*, *myc*, *rel*, *ski*).

Diante destes fatos, é fácil entender porque um desequilíbrio qualitativo ou quantitativo desses genes leva ao crescimento descontrolado e eventualmente à transformação celular.

No caso dos vírus de DNA, as funções de transformação foram localizadas em genes precoces, envolvidos tanto no controle do crescimento viral quanto na transformação da célula hospedeira (28).

Os produtos desses genes estão localizados principalmente no núcleo das células infectadas, a saber: as proteínas E1A e E1B dos adenovírus, o antígeno T grande dos poliomavírus e as proteínas E6 e E7 dos papilomavírus (4). As suas múltiplas funções interferem principalmente com o controle do crescimento celular. Estes genes, entretanto, diferentemente do que se observa com os oncogenes retrovirais, não têm homólogos no genoma celular normal. Possuem, entretanto, algumas regiões de homologia com certas proteínas celulares, e os complexos de ligação formados entre tais proteínas e os produtos de alguns genes virais podem interferir diretamente no controle da proliferação celular. Exemplificando, as proteínas E1A dos adenovírus, T grande do SV40 e E7 dos papilomavírus ligam-se ao produto do gene do retinoblastoma, inativando a sua função de limitar o crescimento celular (37, 59, 47). De forma semelhante, ocorre ligação a p53, outra proteína celular envolvida em controle de proliferação (21), das proteínas Ade E1B, Py LT e HPV E6, nos dois primeiros casos ocorrendo estabilização da proteína celular complexada, enquanto estas proteínas precoces dos tipos de HPVs ditos oncogênicos promovem a degradação de p53 (vide artigo sobre Vírus e Câncer, neste mesmo fascículo).

O fenótipo transformado requer a cooperação entre oncogenes

A obtenção de uma célula transformada e, finalmente, de tumores no animal, requer a contribuição de uma série de eventos tanto genéticos quanto epigenéticos. Descrevemos algumas modificações que ocorrem ao nível de genes celulares que resultam em perturbações da cadeia complexa de controle do ciclo celular, que compreendem a ativação qua-

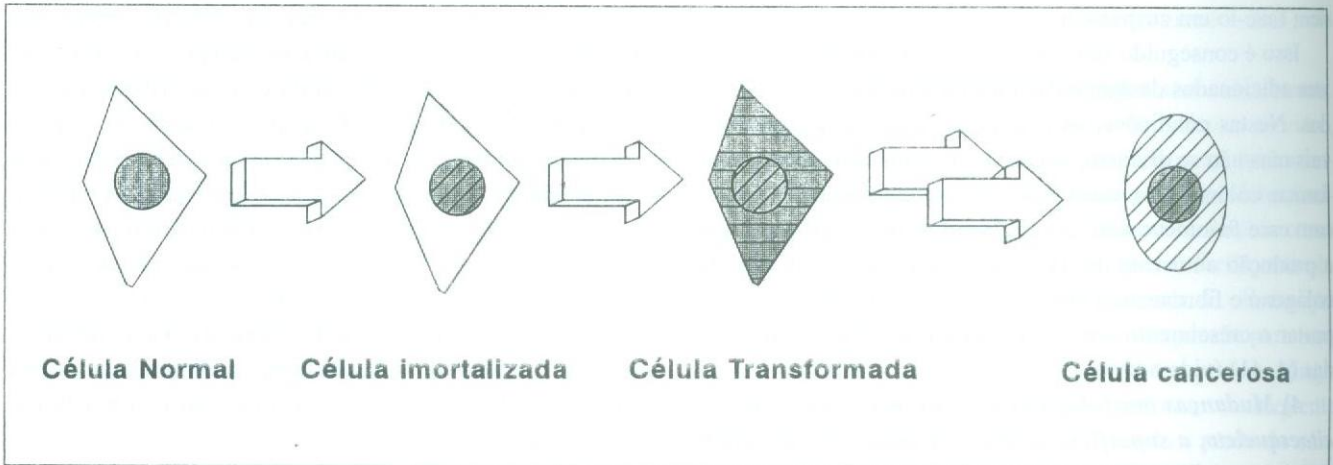


Figura 1 - Modelo de progressão tumoral. De uma maneira geral, dois eventos genéticos são necessários para a transformação celular, envolvendo a cooperação entre oncogenes cujos produtos exercem efeitos a nível nuclear e citoplasmático. Da transformação à cancerização propriamente dita, um número de eventos ainda não determinado é necessário. O processo de progressão tumoral caracteriza-se por uma extensa variabilidade. Diferentes eventos, não excludentes entre si, conferem um fenótipo metastático à célula transformada.

litativa ou quantitativa de protooncogenes.

Frequentemente, entretanto, observa-se a necessidade da ação de dois (ou mais) oncogenes para se obter o fenótipo transformado (33). A expressão de um oncogene nuclear (por exemplo, *myc*) não é suficiente para transformar fibroblastos primários; entretanto, se expressarmos também um oncogene citoplasmático (por exemplo, *ras*) (35), observar-se-á o aparecimento de fibroblastos transformados, capazes de causar tumores em animais de laboratório.

De forma semelhante, se introduzirmos por transfecção o DNA de alguns tipos de papilomavírus humanos em células de roedores imortalizadas, observaremos a formação de focos de células transformadas. Entretanto, a transformação de células primárias, tanto murinas quanto humanas, só terá lugar na presença de um oncogene ativado, e as linhagens derivadas são tumorigênicas (3). Através destes ensaios, pode-se definir que os genes precoces E6 e E7 dos tipos de HPV de alto risco para neoplasias do trato genital são necessários e suficientes à imortalização celular (47). O fenótipo transformado, também nestes casos, requer a ocorrência de outros eventos: a formação de complexos com dois produtos de genes supressores de tumores, p53 e pRB, com as duas oncoproteínas nucleares de HPVs, E6 e E7, respectivamente, parece ser muito importante para a progressão das neoplasias associadas a esses vírus (47).

Adicionalmente, deve-se considerar que a perturbação da proliferação celular imposta pela ação de um conjunto de genes pode levar a anormalidades cromossômicas que resultam em aneuploidia celular. Isto tanto pode representar um desbalanço gênico entre genes celulares normais e oncogenes virais, quanto pode resultar em perda de genes supressores de tumores (22, 31, 48). Em conjunto, estas ocor-

rências se enquadram no modelo de etapas múltiplas apresentado na figura 1, que somadas aos eventos epigenéticos, procuram explicar a indução e progressão tumorais.

O fenômeno de invasão tumoral com ou sem aparecimento de metástases é a expressão clínica do processo de progressão tumoral. Este fenômeno é responsável por cerca de 70 % dos óbitos de pacientes com câncer, e vem sendo extensivamente estudado nos últimos 40 anos. O estudo das metástases, enquanto processo multifatorial e seletivo (42), apresenta as dificuldades inerentes a sua complexidade. As questões levantadas pelos patologistas nos anos 50, como Rupert Willis (60), são essencialmente as mesmas perguntas que são feitas hoje. Recentes avanços tecnológicos nas áreas de Biologia Celular e Molecular permitiram-nos fazer uma descrição bem mais detalhada do processo como um todo, definindo um fenótipo metastático, embora incompleto. O controle genético deste fenótipo é praticamente desconhecido (20).

A hipótese frequentemente aceita para o mecanismo básico de formação de metástases é atribuída a Lance Liotta, e é conhecida como three-step theory (36). Partindo de observações há muito conhecidas pelos patologistas, Liotta divide o processo em três fases distintas:

- saída da célula neoplásica do órgão de origem pela circulação sanguínea ou linfática;
- adesão da célula circulante em elementos endoteliais ou subendoteliais do órgão a ser invadido;
- penetração da célula neoplásica no estroma intersticial do órgão sede da metástase.

Ao longo deste processo, as células neoplásicas interagem com elementos celulares normais elementos da matriz extracelular do hospedeiro. Da Dinâmica destas interações resulta a metástases; assim, pode-se definir o fenótipo

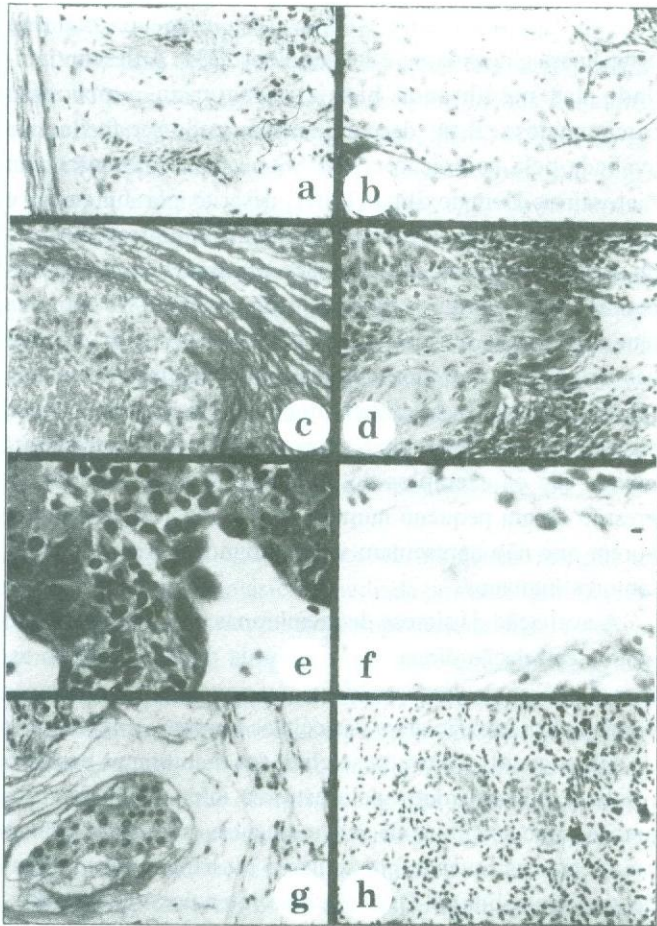


Figura 2 (a) - Epitélio normal (coloração Picrossirius-Hematoxilina-PSH); (b) epitélio tumoral (coloração PSH), descontinuidade da membrana basal; (c) epitélio tumoral (coloração PSH), ruptura da membrana basal com invasão inicial do estroma intersticial; (d) progressão tumoral (coloração PSH), células tumorais invadem o estroma, comprimindo a parede de uma vênula; (e) progressão tumoral (coloração PSH), célula tumoral chega à circulação venosa; (f) progressão tumoral (coloração PSH), célula tumoral em vaso linfático; (g) progressão tumoral (coloração Mucicarmim), embolo venoso; (h) metástase em linfonodo, apresenta padrão bem diferenciado produzindo membrana basal e secreção proteínica para a luz do ácino glandular.

Microfotografias gentilmente cedidas pelo Dr. Humberto Torloni, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo.

metastático em função da expressão de moléculas envolvidas em adesão célula-célula e adesão célula-matriz extracelular.

Estas moléculas são chamadas coletivamente de CAMs (Cell adhesion molecules).

Da transformação celular à invasão tumoral

Considerando a história natural de carcinomas, que representam mais de 80 % dos cânceres registrados no Brasil, podemos analisar as características que uma população de células deve apresentar para gerar metástases. Em um epité-

lio normal (Figura 2-a), as células epiteliais apresentam-se justapostas, como em paliçadas, ordenadas, estratificadas ou não. Esta citoarquitetura é responsável pela manutenção da integridade estrutural e funcional dos tecidos. A camada de células epiteliais geralmente repousa em uma camada de tecido conjuntivo, onde encontram-se os vasos que garantem a nutrição da camada epitelial. A separação entre estas duas camadas é feita por um tipo especializado de matriz extracelular, sintetizado pelas células epiteliais, conhecido como membrana basal.

A membrana basal é uma estrutura supramolecular constituída de colágeno tipo IV (colágeno não intersticial), heparansulfato proteoglicana e glicoproteínas como lamina-entactina ditas intrínsecas (são sintetizadas pelos elementos epiteliais), e fibronectina, dita extrínseca (parte da fibronectina depositada a nível de membrana basal é de origem mesenquimal). Estas glicoproteínas são ácidas e por esta razão podem ser coradas por fucsina descorada (reagente de Schiff), após oxidação pelo ácido periódico, por isto são classificadas como estruturas PAS (Periodic Acid-Schiff) positivas. A membrana basal normal é uma estrutura contínua e de espessura de cerca de 100 nm, em geral, estando indicada por seta na Figura 2-a. O tecido conjuntivo é formado por uma parte celular e pela substância amorfa, conhecida como estroma intersticial.

As principais glicoproteínas do estroma intersticial são colágenos (tipos I e III são os mais abundantes), fibronectina e a proteína não glicosilada elastina; proteoglicanos figuram entre os principais componentes da estrutura macromolecular do estroma intersticial.

Uma das principais características de tecidos epiteliais é a coesão entre as células que formam este tecido. Esta coesão é devida à expressão de moléculas de adesão na superfície de cada célula. Estas moléculas são encontradas em estruturas especializadas como as zônulas de oclusão, zônulas de adesão, desmosomas e junções de tipo *gap* (9). Estas moléculas podem apresentar a capacidade de interação homofílica, isto é duas moléculas iguais interagem entre si. As moléculas de adesão homofílica são expressas em fases precoces da embriogênese, determinado a priori a organização tecidual (histogênese).

Entre as moléculas de adesão homofílica, destacam-se as caderinas (51). Caderinas são moléculas de adesão que dependem de cálcio para exercerem suas funções. Constituem uma família de glicoproteínas expressas em tecidos epiteliais adultos (E-caderina), tecidos nervoso e muscular adultos (N-caderinas) e placenta e algumas células epiteliais (P-caderinas). A perda da expressão de E-caderina em tecidos epiteliais é um dos primeiros eventos observados associados ao processo de transformação celular. Análises imuno-

histoquímicas de adenocarcinomas "in situ" mostraram a diminuição da expressão de E-caderina na região tumoral quando comparada à região normal (39). Ainda, alguns carcinomas podem expressar caderinas, contudo não expressas a nível de membrana plasmática. A desorganização tecidual característica em tumores pode ser explicada, em parte, pela ausência de moléculas responsáveis pela manutenção da citoarquitetura normal. Ensaios "in vitro" com células epiteliais nas quais se bloqueia a expressão de E-caderinas mostraram perda da capacidade das células crescerem em monocamadas (perda da inibição de contato); ainda estas células têm capacidade de invadir estruturas semelhantes ao estroma intersticial. De outro lado, fibroblastos que não expressam normalmente E-caderinas e são células migratórias, perdem a capacidade de invasão quando transfectadas com o gene da E-caderina (7).

Perdas de heterozigose específicas em tumores humanos têm sido úteis na localização de genes supressores de tumores.

Recentemente, a perda de heterozigose do braço longo do cromossomo 16 foi detectado em vários tipos de carcinomas, incluindo o carcinoma hepatocelular (54). Neste caso, a perda de heterozigose mostrou-se associada à região 16q22.1, sítio do gene da E-caderina. Outro exemplo bastante bem estudado é o da perda de heterozigose de genes que são mapeados na região 18q, que ocorre em alta frequência em carcinomas colo-retais.

Um gene desta região, chamado DCC (deletd in colon cancer), codifica uma molécula com características semelhantes a moléculas de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas (19). Acredita-se que esta molécula esteja envolvida na diferenciação do epitélio colônico.

Apesar da perda de inibição de proliferação por contacto, as células tumorais precisam ultrapassar a barreira representada pela membrana basal para terem acesso ao estroma intersticial.

Como mencionado, a membrana basal normal é uma estrutura contínua e em grande parte sintetizada pela célula epitelial.

Uma característica marcante da maior parte das matrizes extracelulares é a dinâmica de renovação de seus constituintes (devido ao turn-over de proteínas que a constitui). O equilíbrio entre degradação e síntese garante a manutenção da continuidade da membrana basal. A degradação dos constituintes da membrana basal é promovida por enzimas proteolíticas normalmente expressas, na maior parte das vezes, pela própria célula epitelial (49). Células tumorais apresentam um desequilíbrio no binômio degradação-síntese, tendendo à ruptura da membrana basal. Entre as enzimas que atuam neste processo de degradação estão os colagenases, plasmina (ativadas pelos ativadores de plasminogênio teci-

dual ou tipouroquinase t-PA e u-PA, respectivamente), catepsinas, glicosidases e heparanases (53). A descontinuidade das membranas basais caracteriza o processo carcinomatoso. Esta descontinuidade pode ser facilmente avaliada pela coloração com PAS ou pela coloração com Picrossirius-Hematoxilina (PSH), descrito por Junqueira e colaboradores (29). Técnicas imunohistoquímicas utilizando-se anticorpos específicos para componentes das membranas basais, como por exemplo colágeno tipo IV e laminina têm se mostrado úteis no estadiamento histológico e avaliação prognóstica de vários tumores, especialmente os de mama (1). Estudos com base epidemiológica são fundamentais para a real avaliação destes marcadores do fenótipo metastático; muitos são os exemplos de moléculas envolvidas na progressão de um pequeno número de modelos experimentais, porém que não apresentam valor prognóstico em séries de tumores humanos.

A avaliação da síntese de membranas basais (Figura 2-b) guarda correlação direta com o grau de diferenciação do tumor. A análise de descontinuidade ou ruptura das membranas basais indica invasão ativa das células tumorais (Figura 2-c).

Ultrapassada a barreira seletiva das membranas basais, a célula neoplásica migra pelo estroma intersticial. Esta migração pode ser induzida por moléculas com propriedades quimiotáticas (quando em solução) ou haptotáticas (quando em fase sólida) (13). O estroma intersticial é de consistência gelatinosa, não apresentando soluções de continuidade para migração ativa de qualquer tipo celular. Da mesma forma que as células da resposta inflamatória, as células neoplásicas precisam liquefazer direta ou indiretamente o estroma, pela ação de proteases.

O estroma intersticial é um complexo reservatório de pequenas moléculas que interagem com os glicoconjugados que constituem o estroma intersticial (glicoproteínas e glicosaminoglicanas) (56). Entre estas pequenas moléculas, os fatores de crescimento e diferenciação como o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e o fator de crescimento transformador-beta (TGF-beta), respectivamente têm sido extensivamente estudados. Estes fatores não são somente armazenados no estroma intersticial, suas funções são moduladas pela interação com glicosaminoglicanas do estroma.

Com a degradação do estroma estes fatores podem ser liberados e tornarem-se atuantes. Uma das funções comuns entre TGF-beta e bFGF é a promoção de angiogênese, isto é, a neorformação de capilares sanguíneos (8). Em relação ao tumor, a capacidade angiogênica possibilita o influxo de nutrientes e o trofismo de células localizadas no interior da massa tumoral. Ainda, estes capilares neoformados apresentam comumente anastomoses com capilares já existentes, permitindo assim a disseminação das células neoplásicas para

outros pontos do organismo do hospedeiro.

O processo de invasão estromal é desencadeado por uma série de eventos. As moléculas constituintes da matriz extracelular geralmente são grandes ($MM > 150.000$), geralmente associadas com dímeros (fibronectina, e.g.), trímeros (laminina e trombospondina, e.g.) ou hexâmeros (tenascina, e.g.). Estas moléculas apresentam vários domínios estruturais e funcionais, isto é, apresentam módulos que exercem diferentes efeitos ao interagirem com células normais ou neoplásicas. Devido à estrutura macromolecular da matriz extracelular, muitos destes módulos são geralmente ocultos, não permitindo sua interação com células normais. No processo de invasão, estes módulos podem se tornar expostos e assim modular o comportamento da célula neoplásica (11).

A interação entre fragmentos ou moléculas íntegras da matriz e a célula neoplásica é mediada por uma família crescente de receptores expressos à superfície celular, coletivamente chamados de integrinas (revisado em 26). Integrinas são glicoproteínas que interagem por meio de domínios extracelulares com a matriz, e por meio de domínios intracelulares com proteínas do citoesqueleto, integrando os meios intra e extracelulares. Integrinas não são somente moléculas de adesão celular envolvida na interação célula-matriz, podendo mediar interações célula-célula.

Do ponto de vista estrutural, as integrinas são heterodímeros formados por uma cadeia alfa e uma cadeia beta.

Até o momento foram descritas mais de 15 cadeias alfa e dez cadeias beta. Diferentes cadeias alfa podem interagir com uma mesma cadeia beta, e vice-versa. Esta propriedade da formação dos dímeros permite a geração de um grande número de receptores com diferentes afinidades pelos seus diferentes ligantes. A maior concentração de informação no momento está nas subfamílias beta-1 (VLA, very late antigens), beta-2 (Leu-CAM, leukocyte cell adhesion molecules) e beta-3 (citoadesinas) das integrinas. Beta-1 e beta-3 são geralmente receptores que medeiam a interação célula-matriz.

Beta-2 integrinas são geralmente associadas à interação célula-célula.

A interação de fragmentos de fibronectina, mas não com a molécula íntegra, com alfa-5 beta-1 integrinas presente em muitas células tumorais, leva a um aumento na expressão do RNA mensageiro de enzimas proteolíticas como colagenase intersticial (58), facilitando assim a invasão tumoral. As enzimas proteolíticas não precisam ser necessariamente sintetizadas pela célula tumoral. A interação de células tumorais com fibroblastos normais do hospedeiro pode induzir que estas últimas produzam enzimas proteolíticas como colagenase intersticial e estromelina III, possibili-

tando o fenômeno de invasão tumoral. Esta subversão da função normal dos fibroblastos ocorre somente naquelas células que estão na interface tumor-estroma, sugerindo que a célula neoplásica secrete algum fator difusível que module a função dos fibroblastos (61).

A liberação de enzimas proteolíticas, e consequente formação de fatores haptotáticos e quimiotáticos não são os únicos elementos no cenário da invasão tumoral. Como na maioria dos processos patológicos, uma típica reação inflamatória ocorre nos tecidos invadidos. O recrutamento de macrófagos e linfócitos NK (natural killer) dá lugar a uma primeira resposta antitumoral não específica do sistema imune. Esta resposta pode ser seguida de uma reação anti-tumoral específica promovida por linfócitos T citotóxicos. Linfócitos T citotóxicos e células NK constituem os chamados linfócitos infiltrantes de tumor (Til-tumor infiltrating lymphocytes), cuja ativação *ex vivo* e re-administração aos pacientes tem sido preconizada como possível forma terapêutica (46). O reconhecimento específico entre células T citotóxicas e células tumorais depende de beta-2 integrinas presentes no linfócito, e de moléculas de adesão presentes na célula tumoral. Recentemente se descreveu em melanomas que a interação entre LFA-1 (uma beta-2 integrina) e ICAM-1 (uma molécula de adesão celular) é imprescindível para a ação do linfócito T. Esta interação deve ocorrer previamente à interação HLA dependente (associada ao principal complexo de histocompatibilidade). A perda de expressão quer de ICAM-1 quer de antígenos HLA pela célula tumoral (20) pode representar um mecanismo de evasão do sistema imune; caso isto ocorra, a célula neoplásica apresentará maior potencial metastático.

A migração das células neoplásicas pelo estroma intersticial, como representado na Figura 2-d, caracteriza o processo inicial da invasão tumoral. Como mencionado acima a disseminação pode ocorrer via vasos neoformados; além disto, a célula neoplásica pode atingir a circulação por meio de elementos vasculares do próprio hospedeiro. A disseminação por vasos linfáticos é aparentemente mais provável que a disseminação inicial por vênulas. Pequenos vasos linfáticos são desprovidos de membranas basais próprias, assim a entrada na circulação por esta via é facilitada. A figura 2-d ilustra uma grande massa de células tumorais empurrando a parede de uma veia de médio calibre. A digestão proteolítica da membrana basal da vênula é necessária para que as células tumorais possam entrar em circulação, como mostrado na figura 2-e. A disseminação por via linfática (figura 2-f) ou venosa (figura 2-g) a partir do tumor primário, não indica necessariamente que o padrão das metástases siga a via hematogênica ou linfática.

Embora controverso, o grande número de anastomoses

linfático-venosas existentes no organismo alteram facilmente as vias de circulação da célula neoplásica. Mais importante que a via inicial de disseminação como determinante dos sítios mais prováveis de estabelecimento de metástases, é a existência de fatores tróficos ou ausência de inibidores de proliferação das células neoplásicas no órgão invadido.

A célula neoplásica circulante

Uma vez na circulação, as células neoplásicas estão expostas a um estresse hemodinâmico. De maneira geral, células isoladas resistem menos a esta situação que grupos de células (êmbolos).

No entanto, é possível identificar-se células isoladas na circulação (Figura 2-f), que efetivamente chegam a linfonodos satélites da lesão inicial. O achado de pequeno número de células malignas em linfonodos, isoladas ou em conjunto, caracteriza a chamada micrometástase.

A maior viabilidade de êmbolos de células neoplásicas do que de células isoladas é, em parte, devida às interações entre plaquetas do hospedeiro e células tumorais. O revestimento do êmbolo tumoral com plaquetas é mediado principalmente por uma beta-3 integrina presente em plaquetas ativadas, conhecida como gpIIb-IIIa (30). Esta integrina age como receptor de fibrinogênio e fibronectina, entre outras proteínas plasmáticas. A interação entre receptor e ligante depende de uma sequência específica de aminoácidos presente nos ligantes.

Esta sequência é arginina-ácido glutâmico-ácido aspártico, que pela mononclatura de aminoácidos é conhecida como RGD. Estudos usando anticorpos monoclonais, que reconhecem a integrina de plaquetas ou usando peptídeos que contenham a sequência RGD, mostram que com estas abordagens pode-se bloquear a agregação plaquetária induzida pelas células tumorais e diminuir a capacidade de metastatização de diferentes modelos experimentais de metástase (40).

A interação plaqueta-célula tumoral facilita o fenômeno de adesão do êmbolo à célula endotelial da vasculatura do órgão a ser invadido. Derivados de ácido aracdônico resultantes do metabolismo plaquetário e da célula tumoral atuam na contratilidade da célula endotelial, promovendo exposição da membrana basal subjacente, passo fundamental na invasão ulterior do órgão sede da metástase (43).

No entanto, não é necessário que plaquetas medeiem sempre a interação célula tumoral-célula endotelial. Esta interação pode ocorrer sem mediadores celulares, e é responsável em parte pela organoespecificidade do processo metastático.

Analisando-se glicoproteínas de células endoteliais de diferentes órgãos observa-se que estas células podem ex-

pressar diferentes conjuntos de glicoproteínas e diferentes formas das mesmas proteínas (por exemplo, proteínas apresentando diferentes padrões de glicosilação) (43). Tem-se identificado em alguns casos que células tumorais que metastatizam para o pulmão, por exemplo, apresentam receptores específicos para proteínas endoteliais de pulmão, não identificadas em outros órgãos (62). Outras glicoproteínas estão associadas ao fenômeno de *homing* da célula metastática, à semelhança do processo que ocorre com os linfócitos; dentre estas proteínas, uma família de glicoproteínas chamada de selectinas e CD44 merecem destaque.

A família das selectinas é constituída por três glicoproteínas descritas até o momento, que medeiam fisio logicamente a interação entre leucócitos e células endoteliais (E-selectina, P-selectina e L-selectina) (38).

São moléculas de adesão celular, envolvidas na interação célula-célula; esta interação é dependente do cátion cálcio, e envolve reconhecimento de estruturas de carboidratos no ligante da selectina. Os resíduos de açúcar envolvidos nesta interação até agora descritos são fucose, ácido siálico e lactosamina, encontrados nos antígenos Lewis (Le^x , Le^y) e sialo- Le^x . As células tumorais frequentemente apresentam um padrão de glicosilação oncofetal quer em proteínas como em lipídios, que é rico na expressão de antígenos Le. Assim, entende-se em linhas gerais como células tumorais podem ser reconhecidas por células endoteliais. As selectinas estão envolvidas na adesão dinâmica da célula tumoral e célula endotelial, um fenômeno conhecido como rolamento. Evidências experimentais sugerem que interações entre glicoesfingolipídios de células tumorais (melanoma murino) e de células endoteliais determinem a etapa inicial do fenômeno de rolamento (32). Selectinas são moléculas acessórias neste processo (34).

CD44 é uma glicoproteína originalmente descrita em leucócitos, também associada ao fenômeno de *homing* e retenção dos linfócitos a nível de órgãos linfóides. CD44 é primariamente um receptor de ácido hialurônico, uma glicosaminoglicana. Interessantemente, variantes de CD44 conferem o fenótipo metastático a linhagens não invasivas de linfomas. O mapeamento destes variantes permitiu estabelecer quais exons são importantes nesta função de retenção a nível de órgãos linfóides (24). A expressão de CD44 v4-v7 está associada à progressão do adenocarcinoma de cólon, o mesmo ocorrendo em adenocarcinomas de mama (H. Ponta, com. pessoal).

Uma vez aderidas, as células tumorais só terão acesso ao parênquima do órgão sede de metástase se forem capazes de induzir a retração da célula endotelial. Como discutido acima, plaquetas podem ser agentes facilitadores deste processo. No entanto, tem-se mostrado em alguns modelos que

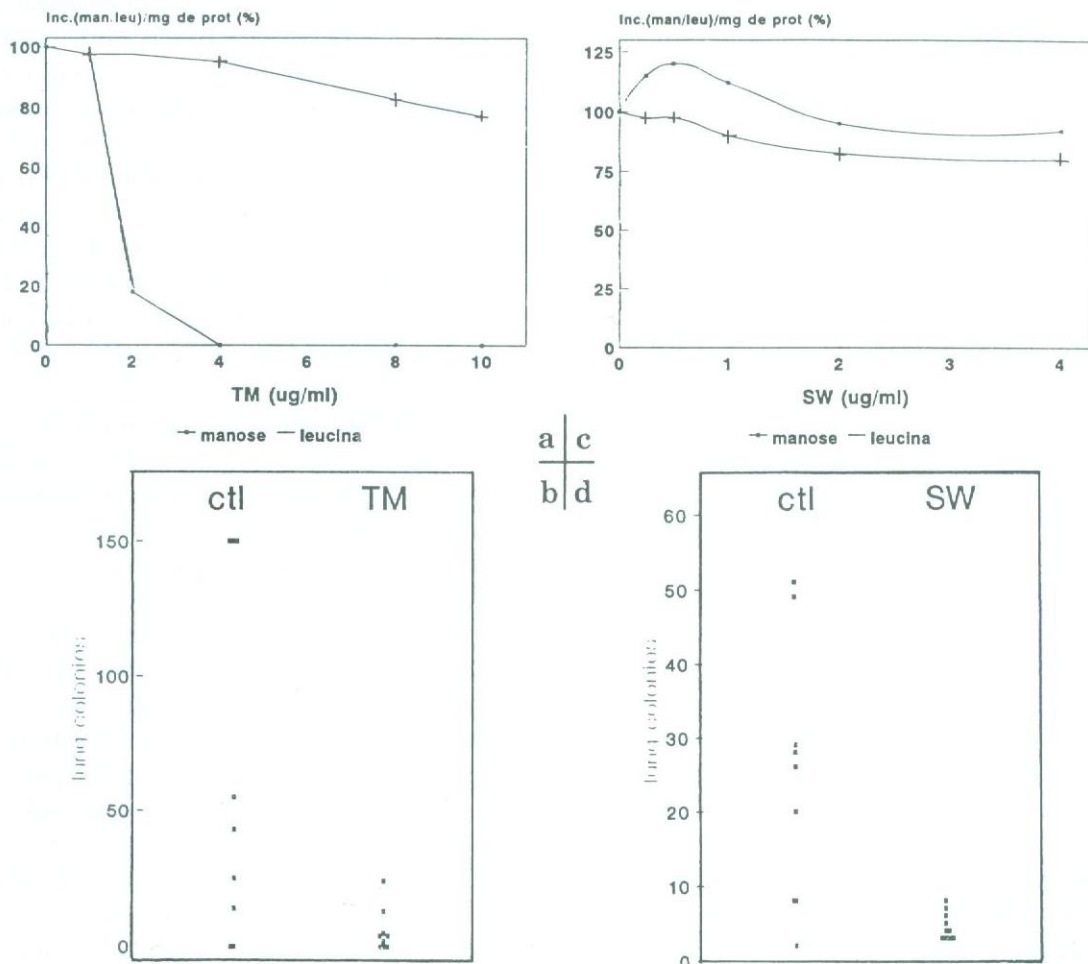


Figura 3 - Efeito de tunicamicina (TM) e swainsonina (SW) no potencial de colonização pulmonar de melanoma murino (modelo B16-F10). Células B16-F10 foram tratadas com doses de TM e SW que alteram especificamente os processos de glicosilação (incorporação de manose), sem interferir com os processos de síntese protéica (incorporação de leucina). Doses de 2 ug. ml⁻¹ e 0.5 mg. ml⁻¹ de Tm e SW (a e c, respectivamente), foram escolhidas como doses de tratamento. Nestas doses, ambas drogas diminuem o potencial de colonização pulmonar de B16-F10 (b e d, respectivamente).

as células tumorais podem estabelecer junções do tipo *gap* com células endoteliais. Estas junções são formadas por proteínas conhecidas como conexinas. Apesar de se descrever perda da expressão de conexinas envolvidas em interações homotípicas e consequentemente desacoplamento iônico no processo de transformação celular; conexinas podem ter um polímero em forma de poro, permitindo a comunicação entre célula tumoral e célula endotelial, em interações heterotípicas. Este poro permite a passagem somente de pequenas moléculas (aproximadamente 1000 Da), como por exemplo prostaglandinas, que atuam na retração do citoesqueleto das células endoteliais (18).

A fase de extravasamento e formação do nódulo metastático

A retração da célula endotelial leva à exposição da mem-

brana basal subjacente. O reconhecimento de elementos desta matriz é fundamental para a retenção das células neoplásicas a nível de membranas basais e a posterior degradação desta matriz durante o processo de invasão. Uma vez no parênquima da sede da metástase, a célula tumoral quer produzindo fatores de crescimento autócrinos, quer respondendo a fatores produzidos pelo próprio hospedeiro, prolifera dando origem ao nódulo metastático, como ilustrado na Figura 2-h.

É possível modular-se a capacidade metastática de células de melanoma murino incubando-as na presença de fibronectina e laminina. Depleção de moléculas de fibronectina a nível de superfície celular ou saturação desta superfície com laminina estão associadas a um aumento do potencial de colonização pulmonar de melanomas (52). Nesta fase, a interação de laminina com células neoplásicas está associada à secreção de enzimas proteolíticas como colagenases (55), favorecendo a migração através desta



matriz. A nível celular, o fenômeno de reconhecimento se manifesta como adesão e espalhamento da célula nas superfícies de laminina. Este espalhamento implica em necessária reorganização do citoesqueleto. Rearranjos de citoesqueleto estão associados à regulação de expressão de diferentes conjuntos gênicos. Interessantemente, a expressão do ativador de plasminogênio tipo uroquinase, diretamente associada ao potencial metastático de melanomas murinos, é regulada por elementos de citoesqueleto (10).

Tratamento das células B16-F10 com inibidores de glicosilação, como tunicamicina (27) e swainsonina (25), diminui o potencial de colonização pulmonar destas células (figura 3). Este efeito está associado a uma menor retenção dos melanócitos a nível pulmonar nas primeiras 24 horas após injeção das células. Neste período inicial, o sucesso da colonização está associado à interação das células tumorais com elementos da membrana basal, como laminina e colágeno tipo IV. O reconhecimento à laminina é mediado por receptores celulares específicos. Descrevem-se atualmente um grande número de moléculas com capacidade de mediar as funções biológicas exercidas por laminina (15). De uma maneira geral, estes receptores têm sido classificados em integrinas e não-integrinas.

A caracterização e compreensão das interações entre células neoplásicas e elementos de matriz extracelular na fase de extravasamento têm sido um dos principais objetivos de estudo do Grupo de Biologia Celular e Molecular do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo. Parte-se da premissa que a fase de extravasamento seja uma etapa limitante da cascata metastática, assim a determinação dos elementos necessários para que esta fase ocorra permitiria a obtenção de marcadores da doença metastática.

Um dos modelos estudados em nosso grupo tem sido o modelo de melanoma murino B16. A linhagem B16 foi estabelecida a partir de melanoma espontâneo de camundongos C57bl-6J, a partir da qual estebeleceram-se diferentes

variantes (sublinhagens). As variantes estudadas neste Instituto são as sublinhagens B16-F1 e B16-F10. Estas variantes se caracterizam por serem altamente tumorigênicas no modelo singênico, não apresentando porém capacidade de metastatização espontânea importante. De outro lado, células da sublinhagem B16-F10, mas não B16-F1, apresentam um alto potencial de colonização pulmonar quando injetadas por via endovenosa. As células B16-F10 constituem um interessante modelo para estudo da fase final do processo metastático, onde o reconhecimento da vasculatura e de elementos da membrana basal subendotelial é crítico no fenômeno de progressão tumoral.

Células B16-F1 apresentam baixo potencial de colonização pulmonar. Utilizando um esquema experimental semelhante ao proposto por Fidler, Lopes e colaboradores neste Instituto obtiveram diferentes variantes de B16-F1 que apresentavam diferentes potenciais de colonização pulmonar (23).

Analisando-se a capacidade destes diferentes variantes agregarem laminina à superfície, verificou-se que os clones mais colonizadores apresentavam maior quantidade de sítios de ligação de laminina que aqueles menos colonizadores. De outro lado, S.S. Veiga e S. Line, também neste Instituto, identificaram em células B16-F10 uma proteína de peso molecular aparente de 120-140 kDa com capacidade de se ligar à laminina em ensaios de ligação direta. Foi possível caracterizar este receptor como um glicoconjugado associado a uma integrina ligante de laminina. Mostrou-se que a interação entre este receptor e laminina é dependente da glicosilação de ambos interagentes (12). O padrão de glicosilação da integrina está associado à função de espalhamento celular, passo necessário para o fenômeno de migração e invasão (14). Estes resultados dão um embasamento celular aos efeitos antimetastáticos observados com o uso dos inibidores de glicosilação. Ainda, têm orientado a determinação de marcadores com eventual valor diagnóstico ou prognóstico em tumores humanos (16).

Summary

Carcinogenesis is a multistep process, in which a normal cell is sequentially immortalized, presents the ability to form tumors and further invades local tissues or colonizes distant organs (metastases). Herein, we review the multiple stages of this process at the molecular level. This approach has been used to outline strategies in the definition of diagnostic or prognostic factors in Oncology. Nevertheless, it has been also possible to postulate some therapeutical trials based on the molecular basis of Cancer. We emphasize here some studies that have been done in our laboratories which present putative clinical applications in a near future.

Referências bibliográficas

1. Albrechtsen, R et al; Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Res* 41: 5076-81, 1981.
2. Baserga R The biology of cell reproduction. Cambridge, Massachussets: Harvard University Press, 1985.
3. Bedell M A et al, Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary Cells. *J Virol* 63: 1247-55, 1989.

4. Benjamin T; Vogt P K - Cell transformation by viruses. In: Fields BN; Knipe eds Fundamental virology. New York, Raven Press, 1990.
5. Bishop J M Cellular oncogenes and retroviruses. Annu Rev Biochem. 52: 301-4, 1983.
6. Bishop J M The molecular genetics of cancer. Science, 235: 305-11, 1987.
7. Birchmeier W et al - Dominant an recessive genes involved in tumor cell invasion. Curr Opin Cell Biol 3: 832-40, 1991.
8. Blood C, H; Zetter B R Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. Biochim. Biophys. Acta 1032: 89-118, 1990.
9. Bock E Cell-cell adhesion molecules. Biochem Soc Transact 19: 1076-80., 1991.
10. Botteri F M et al Disruption of cytoskeletal structures results in the induction of the urokinase-type plasminogen activator gene expression. J Biol Chem 265: 13327-34, 1990.
11. Brentani, R R et al - Expression of receptors for the P1 laminin domain participates in the metastatic phenotype. J. Tumor Marker Oncol. 4: 33-8, 1989.
12. Chammas, R. et al - Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp120/140 - an alpha6/betal integrin. J Biol Chem 266: 3349-55, 1991.
13. Chammas R; Brentani R R - Integrins an metastases: an overview. Tumor Biol 12: 309-20, 1991.
14. Chammas R et al - Functionally distinct roles for glycosylation of alpha and beta integrin chains in cell-matrix interactions. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1795 -, 1993.
15. Chammas R; Veiga S S; Brentani R R - Glycobioly of laminin-integrin interaction and the metastatic phenotype. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86 (suppl. III): 29-35, 1991b
16. Chammas, R, LICR Glycobiology group - integrin glycosylation and the metastatic phenotype. Symposium on Basic and Applied Cancer Research, in celebration to the 10th anniversary of the LICR-SP branch 1993b.
17. Downard J et al, Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. Nature 307: 521-7, 1984
18. El-Sabban M; Pauli, B U - Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. J. Cell Biol 115: 1375-82, 1991.
19. Fearon E et al - Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 247: 49-56, 1990.
20. Feldman M; Eisenbach, L - genes controlling the metastatic phenotype. Cancer Surv 7: 555-72, 1988.
- 21 - Finlay C. A. et al The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 57: 1083-93, 1989.
22. Green, M - When the products of oncogene and anti-oncogenes meet. Cell 56:1-3, 1989.
23. Hartfiel, R; Lopes J D; Brentani R R - Selection of tumor lines for metastasizing capacity is paralleled by increasing number of binding sites for laminin. Proc Am Ass Cancer Res 27: 62, 1986.
24. Herrlich P et al; CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. Immunol Today 14: 395-9, 1993.
25. Humphries M J et al; Inhibition of experimental metastasis by castanospermine in mice: blockage of two distinct stages of tumor colonization by oligosaccharide processing inhibitors. Cancer Res 46: 5215-22; 1986.
26. Hynes R - Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. Cell 69: 11-25, 1992.
27. Irimura T; Gonzalez R; Nicolson G L - Effects of tunicamycin on B16 metastatic melanoma cell surface glycoproteins and blood-borne arrest and survival properties. Cancer Res 41: 3411-8; 1981.
28. Jones N C et al; Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. Gene Dev 2: 267-81, 1988.
29. Junqueira L C; Bignolas G; Brentani R R - Picrosirius staining plus polarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem, J. 11: 447-55, 1979.
30. Karpatsin S et al - Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. J Clin Invest 81: 1012-9, 1988.
31. Knudson A G - Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. Cancer Res 45:1437-43, 1985.
32. Kojima, N et al - Cell adhesion in a dynamic flow system as compared to static system. J Biol Chem 267: 17264-70, 1992.
33. Land J Parada L F Weinberg R A - Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature, 304: 596-602, 1983.
34. Lawrence M B; Springer T A - Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from a and a prerequisite for adhesion through integrins. Cell 65: 859-73, 1991.
35. Levison A D - Normal an activated ras oncogenes and their encoded products. In: Bradshaw R A Prentis S eds Oncogenes and growth factors. New York Elsevier 1987 74-83.
36. Liotta L; Rao C N; Wever U M Biochemical interactions of tumor cells with the basementmembrane. Ann. Rev. Biochem 55: 1037-57, 1986.
37. Ludlow J W et al, SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. Cell, 56:57-65, 1989.
38. McEver R P - Leukocyte-endothelial cell interactions. Curr. Cell Biol 4: 840-9, 1992.
39. Navarro P et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. J. Cell Biol 115: 517-33, 1991.
40. Olden K et al - Use of antiadhesive peptide and swainsonine to inhibit metastasis. Ann. N. York Acad. Sci 551: 421-42, 1998.
41. Plantefaber L C ; Hynes R O Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. Cell, 56: 281 - 90, 1989.
42. Price J E; Aukerman S L; Fidler I J - Evidence that the process of murine melanoma metastasis is sequential and selective and contains stochastic elements. Cancer Res 46: 5172 - 8, 1986.
43. Pauli B U et al - Organ-preference of metastasis. Cancer Metastasis Rev. 9: 175 - 89, 1990.
44. Rapin A M C; Burger M M - Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. Adv. Cancer Res. 20: 1-91, 1974.
45. Reddy E P et al, The oncogene handbook. Amsterdam, Elsevier, 1988.
46. Roserberg A S Immunotherapy and gene therapy of cancer. Cancer Res 51: 5074s - 9s, 1991.
47. Shlegel S A - Papillomaviruses and human cancer. Sem Virol 1: 297-306, 1990.
48. Spandidos D A, Anderson M L M - Oncogenes and oncosuppressor genes: their involvement in cancer. J Pathol 157: 1-10, 1989.
49. Stetler-Stevenson W G - Type IV Collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 9: 289-303, 1990.
50. Stiles, C D et al - Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 76:1279-83, 1978.
51. Takeichi M - A molecular family important in selective cell-cell adhesion. Ann. Rev. Biochem 59: 237-52, 1990.
52. Terranova V P et al Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. Science 226: 982-5, 1984.
53. Tryggvason K Hoyhtya M Salo T Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. Biochim Biophys Acta 907: 191-217, 1987.
54. Tsuda H et al - Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. Proc. Natls. Acad. Sci. USA, 87: 6791-4, 1990,
55. Turpeenniemi-Hudjanen T et al - Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. J Biol Chem 261: 1883-9, 1986.
56. Vlodavsky, I et al - Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. Cancer Metastasis Rev 9: 203-26, 1990.
57. Weinberg R - Oncogenes and the molecular origin of cancer. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1990.
58. Werb Z et al - Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. J Cell Biol 109: 877-89, 1989.
59. Whyte P Williamson N M Harlon E - Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. Cell, 56: 67-75, 1989.
60. Willis R - Pathology of tumors Butterworths, 1960.
61. Wolf, C et al - Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1843 - 7, 1993.
62. Zhu D Cheng C; Pauli B U Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9568-72, 1991.