

Metástase, uma visão atualizada

Fernando A. B. Pitrez¹, Hélio F. Lemchem¹, Rogério Grossmann¹, José Pio Furtado¹, Richard Borba Magalhães², Reginaldo Castilho²

Resumo

Os autores revisam a Cascata Metastática, nome que designa a seqüência de fenômenos que levam à implantação da célula metastática e sua multiplicação no órgão alvo.

Através de uma revisão atualizada da literatura pertinente, expõem as múltiplas teorias e experimentos que tentam esclarecer os complexos mecanismos bioquímicos e enzimáticos que envolvem este fascinante processo, bem como sua implicação terapêutica.

Unitermos: Metástases; cascata metastática.

Apesar do extraordinário desenvolvimento médico dos últimos anos, muitas patologias ainda hoje encerram enigmas intrigantes que persistem como verdadeiros desafios ao avanço científico.

A neoplasia é um desses exemplos mais contundentes. Inobstante o vasto conhecimento a respeito, os seus mecanismos mais íntimos ainda permanecem obscuros, e provavelmente a palavra final sobre o assunto tão cedo não será escrita.

Por que motivo, em um dado momento, um grupo de células começa a multiplicar-se de maneira anárquica, incontroladas pelos sensores orgânicos, e passa a lançar na corrente sangüínea e linfática brotos celulares que se implantam e começam a desenvolver-se da mesma maneira que o foco inicial? São as metástases, que há muitos anos recebem uma atenção especial dos estudiosos no sentido de esclarecer os intrincados mecanismos que determinam o crescimento desenfreado, as vias de disseminação e sua preferência por esse ou aquele órgão.

O presente estudo pretende, através de uma revisão atualizada, trazer, de modo didático, alguns esclarecimentos eminentemente técnicos sobre o assunto, revelando sucintamente algumas experimentações e teorias a respeito, bem como atraentes propostas terapêuticas recentes.

A cascata metastática

O complexo mecanismo de formação das metástases pode ser entendido por uma seqüência lógica de fatos atualmente designados como "Cascata Metastática". A célula neoplásica inicialmente

degrada os componentes da matriz extracelular (MEC) presente no estroma do órgão sítio do tumor primário. Em prosseguimento, a célula metastática desenvolve motilidade, invadindo os tecidos e caindo, por fim, no compartimento intravascular⁽¹⁾.

O transporte das células tumorais na circulação se dá de forma passiva. Tendo sobrevivido a todas as barreiras impostas pelo organismo no sistema circulatório, o passo seguinte é a aderência, implantação e crescimento dessas células no órgão alvo⁽²⁾.

Para sintetizar, podemos dividir a Cascata Metastática em cinco fases principais, sobre as quais embasaremos a presente revisão:

1. dissociação das células do tumor primário e movimento através do estroma tumoral;
2. travessia das células através da membrana basal e entrada na circulação;
3. transporte passivo na circulação;
4. aderência da célula metastática ao órgão alvo e extravasamento;
5. colonização da nova área.

1. Dissociação das células do tumor primário e movimento através do estroma tumoral

O processo de invasão tumoral inicia com a extensão direta de algumas células ou clones celulares do neoplasma primário em direção aos recintos adjacentes. Estas células possuem características de motilidade e invasividade, que são o resultado da combinação de forças mecânicas, de-

¹Oncologistas da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/Hospital Santa Rita.

²Acadêmicos da FFFCMPA.

créscimo da adesividade entre as células tumorais e fatores bioquímicos⁽¹⁾.

A força de expansão tumoral exerce pressão nos tecidos adjacentes, promovendo a separação destes e posterior implantação de células tumorais nestes espaços. Entretanto, em estudos de sistemas tumorais onde esta força de expansão não existia, também ocorreu invasão de células tumorais, determinando, assim, não ser este um elemento essencial para a invasão tecidual⁽²⁾. Na prática clínica, isto fica bem demonstrado nos pacientes que apresentam inúmeras metástases, às vezes disseminadas por múltiplos órgãos, mas apesar de todos os exames realizados não se consegue determinar o tumor primário. São as chamadas metástases múltiplas de tumor primário desconhecido e que corresponde ao TX de classificação TNM.

De um modo geral, as células neoplásicas são mais facilmente destacáveis do que as de qualquer outro tecido normal. Uma modificação metabólica que leva a esta condição é uma produção defeituosa ou diminuição na produção de fibronectina, elemento que auxilia na adesão e organização celular.⁽¹⁾ A "Zônula Aderens" é outro elemento que mantém a adesão celular, e cujo mecanismo possivelmente seja mediado pelas caderinas, que são uma família de moléculas de adesão celular dependentes do cálcio⁽³⁾. Postula-se que uma alteração na regulação das caderinas influencia o potencial metastático; todavia, não existe uma relação direta entre a diminuição das caderinas e o aumento do potencial metastático, simplesmente pelo fato de a célula com baixa regulação de caderinas ter maior facilidade para se desprender do tumor. Ao mesmo tempo esta célula possuirá, igualmente, uma menor adesividade aos elementos figurados no sangue, os quais lhe garantiriam maior chance de sobrevivência na circulação⁽³⁾.

Outro componente relevante na invasão da matriz extracelular (MEC) pela célula neoplásica é a interação direta entre estas células, as células do hospedeiro e a própria MEC.

Liotta (1986) propõe que isso ocorra em três etapas⁽⁴⁾:

- a) adesão à MEC;
- b) degradação enzimática;
- c) motilidade⁽⁴⁾.

A adesão pode ocorrer diretamente entre receptores na membrana da célula neoplásica e componentes da MEC, tais como a Fibronectina e Vitronectina no estroma, e colágeno IV e V e laminina na membrana basal. Os receptores celulares para a MEC podem ser divididos em duas grandes ca-

tegorias: as Integrinas e Não-integrinas. As integrinas são produtos gênicos com afinidade para determinados elementos da MEC. As não-integrinas são determinantes da superfície celular que podem atuar como moléculas adesivas e influenciar no potencial metastático, como é o caso do CD44.⁽³⁾

Uma vez aderida a MEC, o estágio seguinte é a degradação enzimática local de seus componentes por proteases liberadas somente por células metastáticas.

O primeiro a notificar a capacidade dos proteonases em degradar a MEC foi o autor antes citado, correlacionando a expressão da 92 KDa gelatinose com progressão do CA de mama, e de 95 KDa gelatinose com CA de cólon. As enzimas até o momento melhor relacionadas com a degradação da MEC são a Colagenase IV a V, Cathepsina B, Elastase, Heparanase e Ativador do Plasminogênio, entre outras.⁽⁵⁾

Têm sido definidas influências do órgão sítio do tumor primário na ativação das enzimas degradativas da MEC. O colágeno tipo IV é a maior proteína estrutural de membrana basal que existe entre as células do tecido conectivo e as parenquimatosas. A colagenase, obtida a partir de células tumorais metastáticas, atua de forma preferente sobre o colágeno da membrana basal. Em um estudo feito por Cajot et al. (1986), uma linhagem de células tumorais secretava somente uma pró-enzima da colagenase IV, quando na hipoderme, enquanto que no ceco produzia a mesma pró-colagenase IV intacta (inativa) e parcialmente clivada (ativada). O aparecimento de formas ativas da colagenase IV é provavelmente o resultado do aumento da atividade de enzimas presentes no próprio órgão⁽⁶⁾. Vários tipos de enzimas são conhecidas por estarem envolvidas na ativação das Metalloproteinasas, em especial a Uroquinase Ativadora do Plasminogênio (uPA) e o ativador do Plasminogênio Tecidual (tPA). Em outro estudo mais recente, Nakajima demonstrou que em um sítio com muitas metástases foi encontrado um meio com alta concentração de uPA, e num meio com poucas metástases, encontrou-se baixa concentração de uPA⁽⁵⁾.

Todavia, conforme o mesmo autor, não basta que exista uma produção aumentada de uPA para que haja ativação das pró-enzimas, é necessária a presença de receptores na superfície celular capazes de mediar essa ativação.

Acredita-se, ainda, que da mesma forma que existem ativadores das pró-enzimas, possam existir também inibidores, presentes na intimidade dos tecidos. Um destes fatores inibidores é o TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases), que pode

inibir collagenases intersticiais, stromelysina e gelatinases⁽⁷⁾. Inibidores da atividade do plasminogênio (Pai 1 e 2) também já foram demonstrados e se revelaram potentes reguladores negativos da degradação da MEC⁽⁸⁾.

Alguns componentes da MEC também podem estimular a produção e ativação das enzimas. É o caso de uma porção da molécula de laminina A, que estimulou a produção de Colagenase IV e aumento nas metástases pulmonares de melanoma Murino⁽⁹⁾. Fato semelhante ocorre com a Fibronectina, que aumenta a atividade de uPA em CA de mama⁽¹⁰⁾.

Também ocorre no mecanismo de invasão da MEC uma interação entre a atividade das células neoplásicas e as células normais (fibroblastos, macrófagos, linfócitos), que resulta na ativação e liberação de enzimas que degradam a MEC. Ao mesmo tempo, fatores orgânicos, tais como as Interleucinas, fatores de crescimento epidermal e os derivados das plaquetas, também podem estimular a produção e secreção de proteinases de células neoplásicas⁽⁵⁾.

Conforme os experimentos de Stracke et al.⁽¹¹⁾, no ano de 1991, após iniciada a degradação enzimática da MEC, a célula começa a apresentar motilidade para avançar na matriz degradada. Essa motilidade é conseguida de duas formas: uma inclui a descoberta de uma nova classe de citoquinas, o AMF (Autocrine Motility Factor), e a outra um fator quimiotático derivado da degradação da MEC.

As células do tumor primário presumivelmente secretam AMF até concentrações suficientemente altas para estimular a motilidade, através de receptores de membrana, em células aptas a responder a este estímulo. O AMF parece possuir alguma especificidade para as células tumorais. Após a sua ligação com o receptor celular, a movimentação se dá a partir da formação de pseudópodos na célula metastática. A glicólise é, de fato, a origem da energia utilizada durante a motilidade, mas na ausência de incremento de glicólise, a célula pode utilizar respiração mitocondrial como fonte de energia.

O outro fator implicado na motilidade celular é a quimiotaxia, onde moléculas produzidas durante a degradação da MEC serviriam como quimiotáticos e estimulariam o movimento celular. Em um dos seus estudos utilizando componentes da MEC, tais como laminina, fibronectina e colágeno IV, Stracke observou que os mesmos estimularam a motilidade das células neoplásicas, tendo sido essa resposta variável para os diferentes clones celulares em relação às concentrações relativas dos

diferentes componentes da MEC utilizados. Isso significa que existem diferentes receptores nas células metastáticas para as diferentes frações proteicas da MEC.

2. Travessia das células através da membrana basal e entrada na circulação

Neste estágio se repetem os passos da invasão tecidual: ancoragem, degradação enzimática e motilidade, que visam especificamente a ultrapassagem da membrana basal endotelial e subsequente entrada no compartimento intravascular.

Um fator importante nesta etapa é a angiogênese induzida pelo tumor. Tumores com até 2 mm de diâmetro podem receber nutrição por difusão. A partir deste tamanho os tumores estimulam uma neovascularização⁽¹²⁾. Tumores malignos não produzem seus vasos sanguíneos, mas induzem o crescimento de novos capilares a partir do tecido do hospedeiro mediante a ligação de fatores angiogênicos. Alguns destes fatores angiogênicos foram recentemente identificados e isolados por Folkman et al.⁽¹³⁾

Os novos vasos formados são mais suscetíveis à invasão⁽¹⁴⁾, pois geralmente apresentam defeitos estruturais em sua parede, ou por má formação ou por necrose, muito comum nos tumores.⁽¹⁵⁾

Uma vez que o tumor tenha ganho acesso à circulação, ele deve permanecer no sítio de entrada e proliferar para em seguida liberar êmbolos tumorais. Estando nos vasos, tanto a disseminação hemática como a linfática pode ocorrer. A idéia de que sangue e linfa estão separados é errada. Existe grande comunicação entre estes compartimentos, e metástases hemáticas e linfáticas podem ocorrer em paralelo.⁽¹⁶⁾

3. Transporte passivo na circulação

Após atingirem a circulação, as células neoplásicas tornam-se mais sensíveis às barreiras mecânicas e imunológicas. A presença de células tumorais na circulação ainda não se constitui em uma metástase, porquanto a maioria dessas células liberadas são rapidamente destruídas. Muitos êmbolos tumorais são destruídos antes de se implantarem.⁽¹⁷⁾ É estimado que a sobrevivência celular esteja entre 1:1.000 a 1:1.000.000⁽¹⁸⁾. Isso se deve, em parte, ao trauma causado pela turbulência intravascular, adesão inadequada, oxigenação insuficiente ou atividade do sistema imune⁽¹⁾. Um dos mecanismos utilizados pela célula tumoral para evitar a sua destruição é a agregação homotípica:

uma agregação celular tumoral em uma unidade multicelular embólica, onde a porção externa serviria para proteger as células do interior dos danos externos. Outro mecanismo é a agregação heterotípica, onde algumas unidades celulares tumorais se agregam com outras do hospedeiro, como linfócitos e plaquetas, ou estimulam a formação de fibrina ao seu redor, após se aderirem ao leito tecidual receptor.⁽⁴⁾ As metástases podem ser o resultado das células centrais viáveis, protegidas, do meio hostil, pelos agregados circunjacentes.

4. Aderência da célula metastática ao órgão alvo e extravasamento

Tem sido postulado que a localização de uma metástase em um órgão específico pode ser devida a relações vasculares anatômicas e/ou inter-relações entre as células malignas e o órgão alvo⁽¹⁶⁾.

A implantação mecânica é caracterizada pela chegada da célula metastática no primeiro leito capilar encontrado. Este fator é responsável por cerca de 50% de todas as metástases.⁽¹⁹⁾ Uma característica que favorece essa implantação é a formação de êmbolos multicelulares (homotípico): o tamanho do êmbolo favorece sua apreensão no leito capilar.⁽¹⁶⁾

Por outro lado, já em 1889, Paget sugeriu que as metástases são o resultado final de interações muito específicas entre a célula tumoral e o órgão colonizado ("Seed and Soil")⁽²⁰⁾. Uma dessas interações pode ser devida a uma capacidade das células neoplásicas em aderirem a moléculas localizadas na parede vascular. Johnson et al. (1991), em um estudo experimental, demonstrou que preparados de microvasculatura de pulmão apresentaram uma grande avidéz migrante por células metastáticas comumente encontradas neste sítio, enquanto preparados de outros tecidos não apresentaram⁽²¹⁾.

Outro tipo de interação seria a presença de substâncias nas células capazes de intermediar a adesão com o endotélio vascular ("Vascular adhesins")⁽²²⁾. Algumas dessas substâncias são encontradas fisiologicamente em linfócitos, sendo que algumas também servem como mediadoras da adesão das células tumorais (ELAM-1; INCAM-110)⁽²³⁾.

Algumas formas variantes de uma glicoproteína que têm sido propostas como mediadora da adesão de linfócitos à membrana vascular (CD 44), igualmente parecem estar envolvidas no mecanismo de adesão⁽²⁴⁾.

Quando ocorre a adesão das células metastáticas ao endotélio vascular, pode ocorrer a retração

das células endoteliais e a conseqüente exposição dos componentes da matriz extracelular (MEC).⁽²⁵⁾ Esta exposição constitui-se usualmente em um grande substrato adesivo para células tumorais, ao contrário das endoteliais⁽²⁶⁾. A fibrina, componente da interação célula metastática – plaqueta, é outro fator envolvido no dano à membrana basal do endotélio. Essa interação estimula a produção de colagenase IV pela célula metastática, dando início ao processo de degradação enzimática da membrana basal endotelial e conseqüente invasão local do parênquima. Os produtos resultantes da degradação da MEC servem como estimulantes da motilidade celular, auxiliando, conseqüentemente, a invasão do tecido⁽²⁷⁾.

5. Colonização da nova área

A habilidade de algumas células para proliferar no parênquima de um órgão "específico" está associada com as metástases em órgãos específicos; todavia, as bases dessa interação permanecem obscuras. Durante a interação da célula metastática com as células e os sistemas do hospedeiro, fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, sozinhos ou em combinação, podem servir como estímulo ou inibição da proliferação celular metastática⁽²⁷⁾. Este fenômeno caracteriza uma grande influência do meio ambiente do órgão alvo no crescimento da célula metastática, fortalecendo, desta forma, a teoria da "semente e do solo", na qual células tumorais específicas necessitam de um meio ambiente também específico para se desenvolverem. A fim de ratificar tais afirmações, Morikawa et al. (1988), em um estudo experimental feito com populações celulares de carcinoma de cólon com diferentes propriedades metastáticas, implantadas no baço e no ceco de alguns ratos (implantação ortotópica), observou que estas células produziram metástases exclusivamente hepáticas ou para linfonodos. Essas mesmas células, quando implantadas no subcutâneo ou intramuscular, apresentaram um pequeno crescimento e raramente metástases⁽²⁸⁾.

Vários outros fatores influenciam o crescimento metastático no órgão alvo. Um desses é a habilidade da célula em produzir seu próprio fator de crescimento (estimulação autócrina). Alguns são secretados pela célula e interagem com o receptor na membrana celular (CSF-1, IL-2, BOMBESIM e GM-CSF); outros interagem com o receptor no compartimento intracelular (PDGF, IL-3, GM-CSF, BFGF)⁽²⁹⁾. Rodeck et al., realizando experimento com metástases de melanoma humano, cultivadas *in vitro*, mostrou que as mesmas apresentaram um

crescimento autônomo, sugerindo-se o envolvimento de fatores autócrinos de crescimento⁽³⁰⁾. Todavia, somente esses elementos não seriam suficientes para o crescimento tumoral e metastático^(16,27). De extrema importância são os fatores parácrinos, aqueles derivados do órgão alvo. Esses fatores são peptídeos produzidos pela célula normal; contudo, a concentração necessária para estimular o crescimento das metástases é desconhecida.⁽²⁷⁾ Um interessante achado é que a matriz extracelular pode funcionar como um depósito de alguns fatores de crescimento (B FGF, TGF B). O heparan sulfato armazena B FGF ligando-se a ela. Quando ocorre a invasão tecidual do órgão alvo pelas células metastáticas, a heparanase é ativada, degradando o heparan sulfato e liberando a B FGF, que pode interagir com o receptor e estimular o crescimento metastático⁽³¹⁾.

O adenocarcinoma de próstata é um tumor de crescimento lento em seu sítio primário. Frequentemente, este tumor metastatiza para a coluna vertebral, onde, ao contrário, ostenta um crescimento bastante acelerado. Foram encontradas na coluna vertebral substâncias capazes de promover o crescimento de células de carcinoma prostático, sendo, provavelmente, estes fatores os responsáveis por esta diferença⁽³²⁾.

O contato célula-célula também é importante na relação fator de crescimento-receptor. Um precursor de fator de crescimento localizado na membrana celular (TGF) e o seu receptor (EGF) funcionam como mediadores da adesão célula-célula, exercendo uma estimulação mitogênica⁽³³⁾.

O meio ambiente orgânico atua, da mesma forma, inibindo o crescimento das metástases. Alguns fatores inibitórios isolados são a TGF B 2⁽¹⁴⁾ e a AR⁽³⁴⁾ (amphiregulin). Com o tempo, algumas células vêm a perder a sensibilidade aos efeitos inibitórios do crescimento.

Os fatores fisiológicos de regeneração tecidual também parecem exercer influência no crescimento tumoral. Durante o reparo de determinado órgão, aumenta o número de mitoses desse órgão por estimulação de fatores de crescimento fisiológicos próprios do mecanismo de regeneração. Um desses, recentemente identificado, é a TGF, descrita como um regulador fisiológico da regeneração hepática⁽³⁵⁾. Van Dale e Galand (1988) inocularam células de adenocarcinoma de cólon no sistema circulatório porta de ratos parcialmente hepatectomizados e verificaram um dramático aumento do crescimento e incidência de colônias tumorais no fígado desses animais, em comparação com o grupo controle⁽³⁶⁾. Desta forma, quando tecidos nor-

mais, como o fígado, são danificados (possivelmente por invasão de células tumorais), fatores de crescimento são liberados para estimular o reparo do órgão, e, ao mesmo tempo, também estimulam a proliferação das células neoplásicas receptíveis.

Ao chegar no órgão alvo, a célula metastática necessita de suprimento sanguíneo adequado para o seu desenvolvimento. Para isso, libera substâncias que estimulam a angiogênese. Algumas dessas já foram isoladas: TAF (fator de angiogênese tumoral), fatores de crescimento ácidos e básicos dos fibroblastos, angiogenina, fatores de crescimento modificados e prostaglandinas e certas proteases degradativas do soro.^(12,13,37-41)

6. Propostas terapêuticas

Baseados nos conceitos acima delineados, no momento estão em estudo algumas drogas que seriam capazes de bloquear, em algum estágio, a cascata metastática, trazendo novas perspectivas na terapia das metástases. Podem ser divididas nos seguintes grupos:

Antiinvasivas: visam bloquear a invasão do tumor primário, bloqueando enzimas proteolíticas (Aprotinin ou Cysteine)^(42,43).

Antiadesivas: inibem a adesão das células tumorais à fibronectina e laminina, como o peptídeo GRGDS⁽⁴²⁾.

Anti-motilidade: inibem a glicólise, fonte de energia para a motilidade celular. Como exemplo o Oxamato⁽¹¹⁾.

Anticoagulante: devido a conhecidas alterações na coagulação que ocorrem em animais e seres humanos com neoplasias malignas, agentes que afetam a coagulação e a agregação plaquetária têm sido estudados⁽⁴⁴⁾. O Warfarim, já usado em humanos, promoveu um aumento da sobrevivência e retardamento na progressão da doença em pacientes com carcinoma brônquico de pequenas células⁽⁴⁵⁾.

Antiangiogênese: baseado na fato de que o crescimento ou a proliferação de neoplasias primárias e metástases é grandemente dependente de um adequado suprimento sanguíneo, têm sido estudadas drogas que vão interferir com ou inibir a vascularização das células neoplásicas⁽⁴⁶⁾. A primeira droga identificada é o ICRF-159 (razoxane), que inibe a disseminação de células tumorais, normalizando a estrutura da vascularização tumoral e resultando em uma redução do escape de células malignas para a corrente sanguínea⁽⁴⁴⁾.

Bioterápia: visa o controle imunológico da formação de metástases através de substâncias que

estimulariam o sistema imunológico do hospedeiro, como o Interferon⁽⁴⁷⁾ e técnicas para ativação de macrófagos⁽⁴⁸⁾ e anticorpos monoclonais⁽⁴²⁾. Esta, atualmente, constitui-se no enfoque mais atual e promissor na abordagem medicamentosa das metástases.

Summary

The authors described in details Metastatic Cascade that means a phenomenous sequence goes to implantation of metastatic cell and its multiplication on target organ. Actual review was made in agreement with specific literature to explain many theories and trials which try to understand enzymatic and bioquimic mechanisms as well as its therapeutic implications involved in this exciting process.

Uniterms: Metastatic cascade; metastatic cells implantation.

Referências Bibliográficas

1. DUDJAK, L.A. – Cancer Metastasis. *Semin Oncol Nurs*, 8(1):40-50, 1992.
2. KUPEHELLA, C.E. – The spread of cancer: invasion and metastasis. Dimension of cancer. Belmont CA, Wadsworth, 1987.
3. EVANS, C.W. – Cell adhesion and metastasis. *Cell Biol Int Rep*, 16(1):1-10, 1992.
4. LIOTTA, L.A. – Tumor invasion and metastasis – role of the extracellular matrix. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, 46:1-7, 1986.
5. NAKAJIMA, M.; CHOP, A.M. – Tumor invasion and extracellular matrix enzymes: regulation of activity by organ factors. *Semin Cancer Biol*, 2(2):115-27, 1991.
6. CAJOT, J.F.; SORDAT, B.; BACHMAN, F. – Human primary colon carcinoma xenografted into nude mice. II. Modulation of tumor plasminogen activator activity by the host tissue environment. *J Natl Cancer Inst*, 77:1099-107, 1986.
7. KHOKHA, R.; DENHARDT, D.T. – Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis*, 9:391-405, 1989.
8. BLASI, F.; VERDE, P. – Urokinase-dependent cell surface proteolysis and cancer. *Semin Cancer Biol*, 1:117-26, 1990.
9. KANEMOTO, T. et al. – Identification of an amino acid sequence from the laminin A chain that stimulates metastasis and collagenase IV production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:2279-83, 1990.
10. POURREAU-SCHNEIDER, N. et al. – Modulation of plasminogen activator systems by matrix components in two breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA-MB-231. *J Natl Cancer Inst*, 81:259-266, 1989.
11. STRACKE, M.L. et al. – Cell motility, principal requirement for metastasis. *Experientia Suppl*, 59:147-62, 1991.
12. FOLKMAN, I. – How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res*, 46:467-73, 1986.
13. FOLKMAN, I.; KLAGSBRUM, M. – Angiogenic Factors. *Science*, 235:442-7, 1987.
14. FIDLER, I.J.; BALCH, C.M. – The biology of cancer metastasis and implication for therapy. *Curr Probl Surg*, 24:137-209, 1987.
15. POSTE, G.; FIDLER, I.J. – The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283:139-46, 1980.
16. BRODLAND, D.G. et al. – Mechanisms of metastasis. *J Am Acad Dermatol*, 27(1):1-8, 1992.
17. MCCARTHY, J.B.; SKUBITZ, A.P.N.; PALM, S.L. et al. – Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-binding fragment of fibronectin. *J Natl Cancer Inst*, 80:108-16, 1988.
18. ZETTER, B.R. – The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med*, 332:605-12, 1990.
19. LIOTTA, L.A.; KOHN, E. – Cancer invasion and metastasis. *JAMA*, 263:1123-6, 1990.
20. PAGET, S. – Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1:571-3, 1889.
21. JOHNSON, R.C. et al. – Endothelial cell membrane vesicles in the study of organ preference of metastasis. *Cancer Res*, 51:394-9, 1991.
22. BERG, E.L. et al. – Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev*, 108:5-18, 1989.
23. RICE, G.E.; BEVILACQUA, M.P. – An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science*, 246:1303-6, 1989.
24. GUNTHER, U. et al. – A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65:13-24, 1991.
25. NICOLS, G.L. – Cancer metastasis: tumor cells and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta*, 948:175-224, 1988.
26. LICHTNER, R.B.; BELLONI, P.N.; NICOLSON, G.L. – Differential adhesion of metastatic rat mammary carcinoma cells to organ-derived microvessel endothelial cells and subendothelial matrix. *Expl Cell Biol*, 57:146-52, 1989.
27. RUSCIANO, D. et al. – Why do cancer cells metastasize into particular organs? *Bioessays*, 14(3):185-94, 1992.
27. RADINSKY, R. – Groth factors and their receptors in metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2(3):169-77, 1991.
28. MORIKAWA, K. et al. – In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer*, 48:1943-8, 1988.
29. BROWDER, T.M.; DUNBAR, C.E.; NIENHUIS, A.W. – Private and public autocrine loops in neoplastic cells. *Cancer Cells*, 1:9-17, 1989.
30. RODECK, A. et al. – Metastatic but not primary melanoma cell lines grow in vitro independently of exogenous growth factors. *Int J Cancer*, 40:487-90, 1987.
31. RVOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. – Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 64:867-9, 1991.
32. CHACKAL-ROY, M. et al. – Stimulation of human prostatic carcinoma cell growth by factors present in human bone marrow. *J Clin Invest*, 84:43-50, 1989.
33. ANKLESARIA, P. et al. – Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:3289-92, 1990.
34. PLOWMAN, G.D. et al. – The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein

- with tumor inhibitory activity. *Mol Cell Biol*, 10:1969-81, 1990.
35. MEAD, J.E.; FAUSTO, N. – Transforming growth factor may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:1558-62, 1989.
36. VAN DALE, P.; GALAND, P. – Effect of partial hepatectomy on experimental liver invasion by intraportally injected colon carcinoma cells in rats. *Invasion Metastasis*, 8:217-27, 1988.
37. FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ALBERNATHY, C. et al. – Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133:275-88, 1971.
38. FURCHT, L.T. – Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, growth factors. *Lab Invest*, 55:505-9, 1986.
39. D'AMORE, P.A.; KLAGSBRUN, M. – Angiogenesis: factors and mechanisms, in Sirica, A.E. (ed): The pathobiology of neoplasia. Nova York, Plenum, pp. 513-32, 1989.
40. SCHREIBER, A.B.; WINKLER, M.E.; DERNYCK, R. – Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, 232:1250-3, 1986.
41. LIOTTA, L.A.; STETLER-STEVENSON, W.G. – Principles of molecular cell biology of cancer: Cancer Metastasis, in Devita. V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (eds): Cancer Principles and Practice of Oncology, Philadelphia, PA, Lippincott, pp 98-115, 1989.
42. OLDEN, K. – Experimental approaches for the prevention of hematogeneous metastasis. *Oncology*, 11:83-100, 1989.
43. GOLDFARB, R.H.; BRUNSON, K.W. – Overview of current understanding of tumor spread. Fundamental Aspects of Cancer. Dorchecht, Netherlands Kluwer Academic, 1989.
44. POLLACK, V.A. – Therapy of metastasis in animal models, in Oldfarb, R.H. (ed.). Fundamental Aspects of Cancer. Boston, MA, Kluwer Academic, 192-200, 1989.
45. ZACHARSKI, L.R. et al. – Effect of warfarin anticoagulant on survival in carcinoma of the lung. *Cancer*, 53:2046-52, 1984.
46. GIRALDI, T.; SAVA, G. – Selective antimetastatic drugs (review). *Anticancer Res*, 1:163-74, 1987.
47. GORELIK, G.; GUNJI, Y.; GOLDFARB, R.H. – Interaction of tumor cells and immune system in the metastatic process. *Biochem Cell Biol*, 66:617-25, 1988.
48. FIDLER, I.J. – Macrophages and metastasis – biological approach to cancer therapy: Presidential Address. *Cancer Res*, 45:4714-26, 1985.