

44
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IMPORTANCIA DE LAS INTEGRINAS EN EL PROCESO METASTASICO

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA:
MIGUEL ANGEL GARIBAY CASTRO



MEXICO, D. F.



269526

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente

Prof. Homero Hernández Montés.

Vocal

Prof. Ma. del Carmen Parra González.

Secretario

Prof. Marco Antonio Velasco Velázquez.

1er suplente

Prof. Ana María Vázquez Álvarez.

2do suplente

Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas.

Sitio donde se desarrolló el tema: Bibliotecas de la UNAM y Laboratorio de Farmacología Celular, Dpto. de Farmacología, Fac. de Medicina.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por los siguientes proyectos:

DGAPA UNAM IN211396

CONACyT 27572-M

Asesor de tema:

Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez.

Sustentante:

Miguel Angel Garibay Castro.

Dedico este trabajo de investigación a mi madre, a mi padre y a mi tía Rocio, por todo el amor, cariño y apoyo que de ellos he recibido.

De la misma forma quiero agradecer a mi abuelita, a mis hermanos, Angélica y Hugo, al igual que a mis cuñados por su apoyo incondicional y todo su cariño.

Agradezco a todos mis tíos, primos y sobrinos por el cariño que me han tenido.

A mi asesor, Marco Antonio, le doy gracias por darme la oportunidad de ser su alumno, por apoyarme, alentarme, pero sobre todo, por ser mi amigo.

Agradezco a todos mis amigos por los momentos tan agradables que hemos pasado, muy especialmente a:

Jasso, Diana, Enrique, Sergio, Aliesha, Gina, Mariana, Héctor, Tanya, Mayra, Frida, Luisa, Vero, Ariadna, Rafael, Miriam, John, Gustavo, Javier, Donaji, Marta, Liliana y Ruth.

CONTENIDO	PAGINA
I. INTRODUCCIÓN	7
CÁNCER: PROBLEMA PRIORITARIO DE SALUD PÚBLICA.	7
EL CÁNCER ES UNA ENFERMEDAD CELULAR CON ORIGEN GENÉTICO.	7
Diferentes tipos de células dan origen a diferentes tipos de cáncer.	10
LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA ES UN PROCESO DE VARIAS ETAPAS.	10
CÉLULA ALTERADA GENÉTICAMENTE.	11
HIPERPLASIA	11
DISPLASIA	11
CÁNCER IN SITU	11
CÁNCER INVASIVO	11
MECANISMOS GENERALES DE LA METÁSTASIS.	12
CASCADA METASTÁSICA: ETAPAS DEL PROCESO DE INVASIÓN Y DE METÁSTASIS.	13
ANGIOGÉNESIS.	13
PÉRDIDA DEL ANCLAJE CELULAR.	13
INVASIÓN.	14
DISEMINACIÓN HEMATÓGENA.	15
PROLIFERACIÓN DE LA METÁSTASIS.	16
ESTABLECIMIENTO SELECTIVO DE LAS METÁSTASIS.	17

II. OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
III. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA.	22
CARACTERÍSTICAS DE LAS INTEGRINAS.	22
<i>Las integrinas regulan la formación de los complejos de señalización.</i>	26
<i>Las integrinas participan en diversos procesos fisiológicos.</i>	30
<i>Mantenimiento de la arquitectura tisular</i>	30
<i>Regulación de la motilidad y el tráfico celular.</i>	30
<i>Proliferación celular.</i>	30
<i>Regulación de la apoptosis dependiente de adhesión</i>	31
IMPORTANCIA DE LAS INTEGRINAS EN EL PROCESO METASTÁSICO	31
<i>Angiogénesis intratumoral.</i>	32
<i>Desprendimiento de las células tumorales a partir del tumor primario.</i>	33
<i>Interacción de las células tumorales con las plaquetas.</i>	33
<i>Anclaje de las células tumorales en el endotelio vascular y/o la membrana basal subendotelial.</i>	34
<i>Proliferación y supresión de la apoptosis.</i>	35

IMPORTANCIA DE LAS MOLÉCULAS ASOCIADAS A LAS INTEGRINAS EN EL PROCESO METASTÁSICO.	36
INHIBIDORES DE LA ADHESION QUE INTERFIEREN CON LA FUNCIÓN DE LAS INTEGRINAS.	37
<i>Inhibidores que contienen la secuencia Arginina-Glicina-Arpartato.</i>	37
<i>Reguladores de otro tipo.</i>	39
IV. CONCLUSIONES.	41
PERSPECTIVAS	42
V. BIBLIOGRAFIA.	43

INTRODUCCIÓN.

CÁNCER: PROBLEMA PRIORITARIO DE SALUD PÚBLICA.

El cáncer es una enfermedad que en las últimas décadas se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México, según las estadísticas de 1996 de la Secretaría de Salud, el cáncer ocupó el segundo lugar en mortalidad general, precedido por las enfermedades cardiovasculares. Durante 1996, los tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmones causaron el porcentaje mayor de defunciones, seguidos por los tumores malignos del estómago y del cuello del útero.

Al no haberse identificado marcadores bioquímicos que tengan la suficiente sensibilidad y especificidad para la detección temprana del cáncer, la mortalidad se ve favorecida. Aunado a esto, las terapias actuales difícilmente alargan la sobrevivencia del paciente, pues en general, el porcentaje de respuesta a la quimioterapia combinada es bajo (1, 2).

EL CÁNCER ES UNA ENFERMEDAD CELULAR CON ORIGEN GENÉTICO.

Las células del cuerpo generalmente se encuentran bajo un estricto y cuidadoso control del desarrollo. La división celular de los organismos multicelulares depende de ciertos controles complejos. Las proteínas involucradas en el proceso que hace que la célula pase de un estado estacionario a un estado de división activa pueden organizarse en tres grupos: 1) factores de crecimiento y sus receptores; 2) mediadores de vías de transducción de señales y 3) reguladores de la expresión génica. Adicionalmente hay

controles de largo plazo que causan que las células normales envejecen y dejen de dividirse después de un determinado número de ciclos de división.

Todas las células poseen mecanismos similares para regular su transición de una etapa del ciclo celular a otra. Antes de llevar a cabo la división, la célula debe asegurarse que se han terminado la replicación, la reparación del DNA y la segregación de los cromosomas. Las células consiguen este objetivo mediante el uso de controles de retroalimentación, que pueden detectar las fallas en la replicación, la reparación del DNA o el ensamblaje del huso y detener el avance en el ciclo celular. Las fallas en el control de los mecanismos de retroalimentación pueden contribuir a la generación de cáncer.

El ciclo celular está dividido en cuatro etapas: Una fase de síntesis de DNA (S) y otra de división celular (M), las cuales se encuentran separadas por dos fases llamadas G1 y G2. Las células que se encuentran en un estado estacionario (no replicativo) se encuentran en una fase especial llamada G0. Una vez que una célula ha sido estimulada para entrar a un nuevo ciclo, abandona la fase G0 y pasa el punto de restricción en G1. Este puede ser considerado el principal punto de control dentro del ciclo celular.

Los factores de crecimiento mitogénicos se unen a sus receptores específicos e inician una cascada que transduce la señal de crecimiento; como consecuencia se modula la expresión y ensamblaje de diferentes cinasas que permiten que la célula comience a dividirse. Estas cinasas se componen de dos subunidades: una reguladora llamada ciclina y una catalítica llamada cinasa dependiente de ciclina (CDK) (3). Para que se active la cinasa es necesaria la unión de ambas subunidades (4). En las células de mamíferos existen diversos complejos ciclina/CDK que se ensamblan y se activa en

puntos específicos del ciclo celular. Por otro lado, la regulación del ciclo celular también incluye la

unión de los inhibidores de CDK y la fosforilación inhibitoria debida a otras cinasas (5). Los inhibidores de CDK juegan un papel crucial al mediar las señales extracelulares negativas, lo cual provoca que la célula permanezca en la fase G1 del ciclo celular.

La principal característica del cáncer es una proliferación fuera de control de una clona celular. La transformación de una célula normal a una célula neoplásica, se lleva a cabo al producirse mutaciones en genes que codifican para las proteínas que participan en el control de la proliferación (6-8). Los cambios genéticos pueden ocurrir por varios mecanismos, incluyendo las mutaciones puntuales, deleciones, amplificación genética, y translocación. Hay dos principales tipos de genes, cuya mutación puede dar lugar a transformaciones malignas; estos son los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor (antiguamente llamados anti-oncogenes).

Los proto-oncogenes codifican proteínas que, en condiciones normales, estimulan la división celular. Las formas mutadas de estos genes (oncogenes), pueden causar que las proteínas estimulantes sean sobreactivadas, resultando en una proliferación celular excesiva. De acuerdo con la función que realiza el producto génico, los oncogenes se clasifican en:

Genes que codifican factores de crecimiento o sus receptores (por ejemplo el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF); genes codificantes de proteínas citoplasmáticas involucradas en la transducción de señales estimulantes (por ejemplo

las proteínas de la familia Ras); genes que codifican factores de transcripción y que activan genes promotores del crecimiento (por ejemplo c-myc); y genes que codifican para moléculas cuya función no se ha especificado (mdm2) (7-9).

Los genes supresores de tumores codifican proteínas con efecto regulador negativo en el crecimiento celular. Las mutaciones pueden causar que las proteínas producidas sean inactivas, evitando la regulación del crecimiento celular. Existen diferentes tipos de genes tumor supresor:

Genes que codifican proteínas citoplasmáticas (por ejemplo nf-1); genes que codifican proteínas nucleares (por ejemplo p53); y genes que codifican proteínas cuya localización celular no ha sido esclarecida aún (por ejemplo brca-1, -2) (7-10).

Diferentes tipos de células dan origen a diferentes tipos de cáncer.

Los tumores malignos se clasifican tomando en cuenta el tejido que da origen al tumor. Los carcinomas son tumores malignos de origen epitelial (que son las fuentes más comunes de cáncer). Los sarcomas son los crecimientos malignos de músculo y tejido conectivo. Los adenocarcinomas son tumores malignos de origen glandular. Las leucemias se generan a partir de la transformación de células hematopoyéticas (6, 12).

LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA ES UN PROCESO DE VARIAS ETAPAS.

Hay evidencia que indica que las células dentro de la mayoría de los tumores provienen de una sola célula alterada genéticamente; sin embargo una sola mutación en una de las células no es suficiente para llevar a cabo una transformación maligna. La acumulación de mutaciones, así como la selección y la expansión clonal, resultan

en la heterogeneidad celular que presentan los tumores malignos.

Las etapas por las cuales atraviesa el desarrollo neoplásico son las siguientes:

Basado en los artículos de Weinber R. (9) y Ruoslahti E. (11).

CÉLULA ALTERADA GENÉTICAMENTE. La génesis de un tumor comienza cuando una célula dentro de una población normal sufre una mutación genética que incrementa su susceptibilidad a proliferar cuando debería permanecer en G₀.

HIPERPLASIA. La célula alterada y sus descendientes continúan con apariencia normal, pero se reproducen en exceso; esta condición se denomina hiperplasia. Años después, una de estas células sufre otra mutación que la conduce a una pérdida del control en el crecimiento celular.

DISPLASIA. Adicionalmente a la proliferación excesiva la descendencia de esta célula presenta apariencia anormal en estructura y orientación, se dice entonces que el tejido presenta displasia. Se requiere de otra mutación que altere el desempeño celular para que se origine esta condición.

CÁNCER IN SITU. Las células afectadas se vuelven más anormales en el patrón de crecimiento y apariencia. Si el tumor no ha rebasado los límites entre los tejidos es llamado cáncer in situ. El tumor puede permanecer en este estado indefinidamente, sin embargo, algunas células pueden adquirir eventualmente mutaciones adicionales. Aún en esta etapa la cirugía constituye un tratamiento efectivo.

CÁNCER INVASIVO. Si los cambios genéticos permiten que el tumor comience a invadir la subcapa de tejido y a diseminar células a través del flujo sanguíneo o linfático, se considera que la masa ha llegado a ser maligna. el microambiente hipóxico,

que es muy común en los tumores sólidos, puede estimular la mutación de genes; la hipoxia, puede seleccionar las células tumorales más agresivas, que tienen más susceptibilidad a producir nuevos tumores (metástasis). Estas células son capaces de establecerse y desarrollarse en órganos y tejidos distintos a los que les dio origen. La formación de nuevos tumores, comúnmente lleva a la muerte del paciente, debido a la disfunción de órganos vitales.

MECANISMOS GENERALES DE LA METÁSTASIS.

La metástasis no es otra cosa que la diseminación de las células tumorales a sitios distantes en el cuerpo y son la causa de que el cáncer sea fatal. Por lo tanto las metástasis y la invasividad a tejidos normales por parte de las células tumorales son los marcadores de malignidad. Experimentalmente se ha observado que diferentes poblaciones clonadas a partir del mismo tumor, daban como resultado un patrón metastásico diferente (13). Algunas clonas eran más agresivas que otras, con lo cual se ha postulado la teoría de la heterogeneidad dinámica, modelo que propone que las células pueden adquirir propiedades metastásicas que se heredan, pero estos cambios son inestables. Así, una población en desarrollo tiende a establecer un equilibrio dinámico entre una subpoblación pequeña de células altamente metastásicas y una subpoblación mayoritaria de células esencialmente no metastásicas (14, 15).

CASCADA METASTÁSICA: ETAPAS DEL PROCESO DE INVASIÓN Y DE METÁSTASIS. Para que las células malignas abandonen el tumor primario y

prolifíeren en un sitio distante, se requieren varios eventos (16). En el proceso de invasión y metástasis se pueden reconocer diversas etapas:

ANGIOGÉNESIS.

La generación de vasos sanguíneos (angiogénesis) es un paso esencial para el crecimiento del tumor primario. La rica vascularización del tumor incrementa las posibilidades para que las células tumorales alcancen el torrente sanguíneo y colonicen sitios secundarios. Se ha observado una correlación inversa entre el tiempo de supervivencia de los pacientes y el grado de vascularización del tumor. Este fenómeno se ha descrito en diversos tipos de tumores, incluyendo gástricos (17), prostáticos (18), mamarios (19), esofágicos (17), vulvares (20) y melanomas (21).

El proceso de la angiogénesis puede subdividirse en las tres etapas siguientes:

i) proliferación de las células endoteliales; ii) rompimiento de la matriz extracelular; y iii) migración de las células endoteliales. Estos pasos pueden ser promovidos por ciertos factores de crecimiento secretados por las células tumorales, estos factores son denominados factores angiogénicos (17, 22, 23).

PÉRDIDA DEL ANCLAJE.

En el tejido normal las células se adhieren tanto una a otra, como a un retículo de proteínas fibrilares insolubles, conocido como matriz extracelular, el cual llena el espacio entre las células. El anclaje de las células tumorales a la matriz extracelular impide que éstas se diseminen, se necesita modificar la capacidad adherente de dichas células para que estas puedan desprenderse del tumor primario (pérdida del anclaje celular). Se sabe que las interacciones celulares con la matriz extracelular son mediadas por moléculas de adhesión de diferentes familias (23-25).

INVASIÓN .

La penetración de las barreras de la matriz extracelular por las células tumorales (invasión) es un proceso activo de translocación de células neoplásicas a través de las barreras de la matriz extracelular. Las membranas basales de los tejidos y de los vasos sanguíneos, constituyen barreras que deben ser superadas por las células tumorales invasoras (23, 26, 27). Los mecanismos de invasión usados por las células tumorales parecen ser similares a aquellos utilizados por células no malignas para cruzar los límites de los tejidos bajo condiciones fisiológicas; por ejemplo los leucocitos abandonan los vasos sanguíneos en respuesta a un factor quimiotáctico.

La invasión requiere de la extensión de un pseudópodo, de proteólisis local de la matriz extracelular, y de la migración celular. La extensión del pseudópodo esta acoplada con otros eventos celulares involucrados en la invasión, como la activación de la proteólisis local. El extremo líder de la célula es el que expresa y secreta proteasas activadas; además, el extremo líder es requerido para afianzarse a la matriz extracelular y permitir que la célula pueda avanzar (26, 28, 29). Adicionalmente, el pseudópodo celular invasor puede activar proteasas latentes y citocinas que se encuentren almacenadas dentro de la matriz extracelular. Se sabe que si los niveles de expresión de proteasas aumentan, el tumor es más agresivo; por ejemplo, los tumores que han producido metástasis expresan altos niveles de colagenasa tipo IV (gelatinasa B) así como de las catepsinas B y L (30, 31).

La motilidad de las células tumorales es también un importante componente de la invasión; la estimulación de la motilidad contribuye a la formación de metástasis. Los factores que favorecen la motilidad pueden ser divididos en tres grupos:

El primero consiste de factores que son secretados por las propias células tumorales, o factores de motilidad autócrinos. Al menos 11 de estos factores han sido identificados. El segundo grupo corresponde a péptidos derivados de proteínas de la matriz extracelular que se generan por acción de enzimas hidrolíticas. El tercer grupo está constituido por los factores de crecimiento secretados por el huésped, tales como el factor de crecimiento relacionado a la insulina-I (IGF-1), interleucina 8 (IL-8) y la histamina. Estos últimos son factores de motilidad parácrinos y han sido referidos como factores internos porque causan que las células tumorales se muevan hacia los órganos que los produce (32-34).

DISEMINACIÓN HEMATÓGENA .

La entrada de las células al torrente sanguíneo y su posterior alojamiento en sitios de la microcirculación (diseminación hematológica) puede deberse a dos causas; primero a una invasión de la masa tumoral hacia los vasos sanguíneos o, segundo, por una vasculatura anormal de los tumores. Las metástasis se subdividen en dos grupos: aquellas que se diseminan vía linfática y que se establecen en nódulos linfáticos regionales, y aquellas que se diseminan vía el sistema vascular sanguíneo y que se desarrollan en sitios y órganos a mayor distancia. En general el sitio inicial de la metástasis tiende a ser el órgano que contiene la primer red capilar encontrada por las células después que son liberadas del tumor. Para los tumores cuyo drenaje vascular es el sistema venoso estos órganos pueden ser los pulmones, mientras que para los cánceres gastrointestinales el órgano blanco es el hígado. Afortunadamente, parece ser que el proceso de metástasis es altamente ineficiente, puesto que se han tomado muestra sanguíneas de pacientes a los que se les ha extirpado un tumor y en

las cuales a pesar de haberse encontrado miles de células en el torrente sanguíneo, los pacientes no desarrollaron metástasis. Se ha calculado que sólo el 0.1% de las células que logran ingresar a la circulación sobreviven para implantar un tumor secundario (35, 36).

El establecimiento de las células tumorales en los pequeños vasos sanguíneos de los órganos ha sido asociado con la formación de trombos, que involucran la interacción de las células tumorales con plaquetas y leucocitos. Aunque estas interacciones no son indispensables para el proceso metastásico, la administración de anticoagulantes puede reducir el número de metástasis después de una inyección intravenosa de células malignas (metástasis experimentales), pero tiene poco efecto sobre la generación de tumores secundarios generados a partir de la implantación subcutánea de células tumorales (metástasis espontáneas) (37).

PROLIFERACIÓN DE LA METÁSTASIS.

Después de abandonar la circulación, es necesario que las células neoplásicas puedan migrar a través del tejido conectivo. La colonización de los sitios secundarios requiere de la proliferación de las células tumorales. Varios grupos de factores de crecimiento funcionan como reguladores de la proliferación del tumor, por ejemplo, las células del melanoma producen muchos reguladores de crecimiento positivos, como el bFGF y la IL-8, que funcionan como factores de crecimiento autócrinos. En cambio el IGF-I funciona como regulador positivo del desarrollo de la metástasis, con actividad parácrina, al igual que el factor de crecimiento epidermal (EGF) (23, 38). De la misma forma el desarrollo de la metástasis del hueso puede ser influenciada por los factores de crecimiento derivados de la médula ósea, osteoblastos, o de los productos de la

matriz del hueso, liberados por la resorción osteoclástica del hueso.

La Figura 1 esquematiza las etapas del proceso de invasión y metástasis (39).

ESTABLECIMIENTO SELECTIVO DE LA METÁSTASIS.

Ciertos tipos de tumores tienden a generar metástasis en órganos blanco específicos. Los sitios secundarios más comunes para la proliferación de la metástasis de cualquier tipo de cáncer, son los pulmones, el hígado, los nódulos linfáticos, la médula ósea y el cerebro (40, 41)..

Se ha postulado una teoría que pretende explicar la preferencia por un determinado órgano para el establecimiento de un tumor secundario con base en consideraciones hemodinámicas. Por ejemplo, el número de las metástasis que se desarrollan en un órgano está relacionado al número de células tumorales que arriban a ese órgano por la sangre. Sin embargo las consideraciones hemodinámicas no explican totalmente la preferencia selectiva de las células tumorales en un órgano específico; por lo que existe otra teoría que postula que existen interacciones diferenciales entre la célula tumoral y el órgano hospedero. La alta proporción de metástasis hacia el hueso en los cánceres de mama, próstata y pulmón son ejemplos de este tipo de establecimiento.

Se han planteado tres principales mecanismos que explican como se favorece el establecimiento órgano-específico:

El primero es un crecimiento selectivo, las células tumorales sufren una extravasación al azar, pero se desarrollan selectivamente solo en los órganos que tienen los factores de crecimiento o el ambiente de matriz extracelular adecuados.

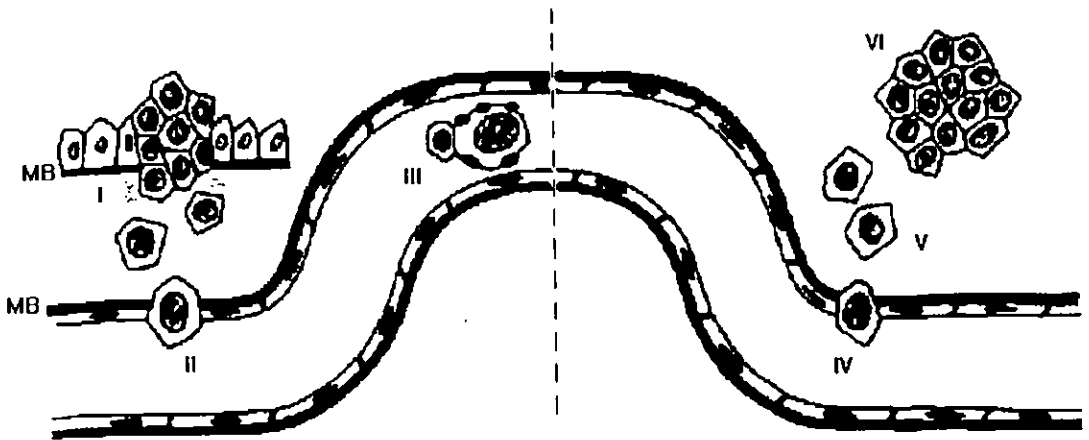


Figura 1. Etapas del proceso de metástasis (39).

- I) Crecimiento tumoral y separación de células neoplásicas a partir del tumor primario.
- II) Migración hacia la vasculatura.
- III) Interacciones con plaquetas y leucocitos en la luz vascular.
- IV) Adhesión de la célula tumoral al endotelio vascular.
- V) Migración hacia el tejido blanco.
- VI) Crecimiento tumoral en el sitio de metástasis.

El segundo mecanismo es de adhesión a sitios específicos presentes únicamente en la superficie del lumen endotelial de determinados órganos.

El tercer mecanismo es de quimiotaxis selectiva de células tumorales circulantes hacia el órgano productor de factores atrayentes solubles (43). La tabla 1 refiere los órganos que han sido identificados como preferentes para la implantación de las metástasis generadas por diferentes tipos de tumores

Tabla 1.

METÁSTASIS CLÍNICAS A ÓRGANOS BLANCO ESPECÍFICOS (42).

TUMOR PRIMARIO	SITIO COMÚN DISTANTE SECUNDARIO
Carcinoma de riñón de células claras	pulmón, hueso, adrenal
carcinomas gastrointestinales	hígado
carcinoma prostático	hueso
carcinoma de pulmón de células pequeñas	cerebro, hígado, médula ósea
melanoma en la piel	hígado, cerebro, intestino
melanoma en ojo	hígado
neuroblastoma	hígado, adrenal
carcinoma de mama	hueso, cerebro, adrenal, pulmón, hígado
carcinoma folicular de la tiroides	hueso, pulmón

Las metástasis tumorales son responsables de una gran proporción de muertes por cáncer. Las terapias que disminuyen el número de células neoplásicas disminuyen

también, la probabilidad que éstas invadan otros órganos; sin embargo estos medios no son suficientes para curar el cáncer. Por esta razón se buscan nuevos tratamientos que inhiban la capacidad invasiva de las células neoplásicas. Las integrinas han sido señaladas como blancos potenciales para la intervención terapéutica en el cáncer. (44, 45). Se han utilizado modelos murinos para demostrar que la modificación en la adhesión mediada por integrinas tiene efecto en la progresión de las neoplasias.

Basado en estos antecedentes, este trabajo pretende cubrir los siguientes

II. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Compilar la información reciente sobre la relación existente la producción de metástasis y las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Describir las características bioquímicas y fisiológicas de los receptores de la familia de las integrinas.

Describir cuales son las etapas del proceso metastásico que son favorecidas con la participación de las integrinas.

Describir las moléculas que interfieren con la función de las integrinas y que, por lo tanto, tienen un potencial uso como fármacos antimetastásicos.

III . INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA.

CARACTERÍSTICAS DE LAS INTEGRINAS.

Las integrinas constituyen una familia de glicoproteínas de superficie que funcionan como receptores para algunas moléculas de la matriz extracelular. Todas ellas son heterodiméricas, formadas por dos glicoproteínas transmembranales, una α y una β , que contienen una sola región hidrófoba (46).

La subunidad α , de las cuales se han reportado 16 tipos diferentes, tiene tamaños variantes entre 120 y 180 kD. Esta subunidad contiene una repetición de siete dobleces de un segmento homólogo; al menos tres de estas copias contienen la secuencia aspartato-x-aspartato-x-aspartato-glicina-x-x-aspartato, o secuencias relacionadas. Estas regiones contribuyen a la unión de cationes divalentes a estas subunidades. La presencia de estos iones es esencial para la función del receptor, pues estabilizan tanto la unión heterodimérica como la unión al ligando (47, 48).

La subunidad β , de las cuales se han reportado 8 distintas, tienen tamaños que varían entre 90 y 110 kD. Una característica de todas las subunidades β es un segmento de cuatro dobleces en una zona rica en cisteínas, que forma puentes disulfuro internos. El extremo NH_2 terminal (de 40-50 kD) está levemente plegado con regiones internas disulfuro, que contribuyen al arreglo espacial del dominio de unión al ligando. Recientemente se ha identificado un sitio de unión a algunos cationes divalentes (48).

Los dominios extracelulares de ambas subunidades se asocian, de manera no covalente, para formar el heterodímero α/β , dichos dominios son de más de 75 kD en

el caso de la subunidad β y de más de 100 kD en el caso de la subunidad α . Los dominios transmembranales y citoplasmáticos no son esenciales para la asociación en el receptor, puesto que formas recombinantes de ambas subunidades que carecen de estos dominios pueden asociarse dando lugar a heterodímeros que conservan la función adherente. Los dominios citoplasmáticos son cortos (de alrededor de 50 aminoácidos) excepto en el caso de la subunidad β_4 , cuyo dominio citoplasmático es de 1000 aminoácidos. Las imágenes por microscopía electrónica de diversas integrinas muestran una cabeza globular, que comprende partes de ambas subunidades, y dos tallos que se extienden hacia la bicapa lipídica. Ambas subunidades contienen puentes disulfuro internos que estabilizan la conformación de cada una de las cadenas del receptor. La estructura y función de las integrinas fue revisada por Hynes R. en 1992 (25).

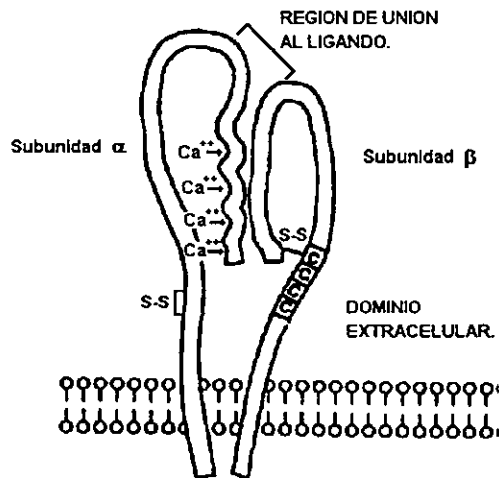


Figura 2. Representación esquemática de una integrina (25).

Se conocen 21 heterodímeros, los cuales se pueden agrupar en subfamilias de acuerdo a la presencia de una cadena (común. La mayoría de las integrinas reconocen moléculas de la matriz extracelular como laminina, colágena, fibronectina y vitronectina. La secuencia Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) contenida en ciertas moléculas de la matriz extracelular se ha identificado como sitio de unión a integrinas (49). Otras, sobre todo las integrinas de la subfamilia (2 pueden participar en la adhesión célula-célula reconociendo moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La Tabla 2 muestra las combinaciones conocidas de subunidades y sus respectivos ligandos.

Las integrinas se encuentran expresadas en un gran número de células, aunque cada estirpe celular presenta un repertorio limitado de estas moléculas. La especificidad y afinidad de una integrina dada en una célula particular, no son constantes. Individualmente, las células varían sus propiedades adhesivas mediante la expresión selectiva de integrinas; adicionalmente se introduce una versatilidad debida a la habilidad de las células para modular las propiedades de unión de las integrinas (modulaciones en la especificidad y en la afinidad) (51, 52). En las plaquetas la integrina $\alpha 2\beta 1$ es específica para colágena y no para laminina, mientras que en otras células reconoce ambos ligandos, lo cual puede indicar la presencia de formas variantes de esta integrinas (53). La presencia de lípidos o cationes divalentes afecta la especificidad para el ligando de las integrinas; Estas observaciones muestran que el contexto celular afecta la afinidad (54, 55). Las células T, después de ser activadas por un antígeno o por ésteres de forbol, activan las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y

Tabla 2. LIGANDOS DE LAS SUBFAMILIAS DE LAS INTEGRINAS (25).

Receptor.	Sinónimos.	Ligando o contrarreceptor.
Integrinas $\beta 1$		
$\alpha 1\beta 1$	VLA-1	Colágena Tipo I y IV, laminina.
$\alpha 2\beta 1$	VLA-2	colágena Tipo I y IV, laminina, ¿Fibronectina?
$\alpha 3\beta 1$	VLA-3	Epiligrina, laminina, nidogeno/entactina, fibronectina, colágena tipo I.
$\alpha 4\beta 1$	VLA-4	Fibronectina, VCAM-1.
$\alpha 5\beta 1$	VLA-5	Fibrinógeno.
$\alpha 6\beta 1$	VLA-6	Laminina.
$\alpha 7\beta 1$	VLA-7	Laminina.
$\alpha 8\beta 1$?
$\alpha 9\beta 1$?
$\alpha v\beta 1$		Fibronectina.
Integrinas $\beta 2$		
$\alpha \beta 2$	LFA-1	ICAM -1, -2, -3.
$\alpha \beta 2$	CR3	C3bi, fibrinógeno, ICAM-1, factor de coagulación X.
$\alpha \beta 2$	p150	Fibrinógeno, ¿C3bi?
Integrinas $\alpha \beta 3$		
$\alpha \beta 3$	GPIIb-IIIa	Fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand, vitronectina.
$\alpha \beta 3$	VNR	Fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand, vitronectina, laminina, trombospodina.
Integrinas $\alpha \beta 7$		
$\alpha \beta 7$	LPAM-1	Fibronectina que contiene la región IIIICS, VCAM-1, MAcAM.
$\alpha \beta 7$	HML-1	Cadherina E.
Otras Integrinas		
$\alpha 6\beta 4$	TSP180	Laminina.
$\alpha v\beta 5$		Vitronectina.
$\alpha v\beta 6$		Fibronectina
$\alpha v\beta 8$?

$\alpha 6\beta 1$, sin cambiar las concentraciones de estas integrinas en la superficie celular (56). En ciertos casos las integrinas pierden actividad durante el desarrollo, pero persisten en la superficie. Es el caso de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en queratinocitos y la integrina $\alpha 6\beta 1$ en neuronas retinales. La fosforilación de la cadena $\beta 1$ por la proteína pp60scr (codificada por el genoma del virus del sarcoma de Rous) reduce la unión de las correspondientes integrinas a fibronectina.

Otro ejemplo de la regulación de afinidad de las integrinas está dado por las plaquetas circulantes, cuya integrina $\alpha IIb\beta 3$ (glicoproteína IIb/IIIa) no se une a sus ligandos solubles, sin embargo dicha integrina se vuelve un receptor efectivo de fibrinógeno soluble cuando las plaquetas son activadas por trombina o colágena (57). Estos cambios están acompañados por un cambio conformacional que puede ser detectado inmunológicamente (58).

Las integrinas regulan la formación de complejos de señalización.

Como consecuencia del reconocimiento al ligando, las integrinas se agregan en complejos especializados que se conocen como sitios de adhesión focal. Los complejos formados funcionan como una conexión matriz extracelular-citoesqueleto y como regiones transductoras de señales de control del crecimiento. Después de la unión a ligando, ocurre un cambio conformacional en los dominios citoplasmáticos de la integrina, permitiendo que la subunidad β interactúe con otros componentes del sitio de adhesión focal (59). En estas estructuras se concentran, además de las integrinas, las proteínas del citoesqueleto (α -actinina, vinculina, talina, tensina y paxilina) y proteína cinasas (59-61). Una de las moléculas más importantes en la

señalización mediada por las integrinas, es la cinasa de adhesión focal (FAK). FAK que es una tirosina-cinasa con tres dominios: i) el dominio amino terminal, que se une a la región citoplasmática de la subunidad β de las integrinas; ii) el dominio central es el dominio catalítico, y iii) el dominio carboxilo terminal, que puede unirse a otras proteínas del complejo de adhesión focal. La unión al ligando y la agregación de las integrinas en estos sitios activa a la FAK; la consecuente fosforilación de las proteínas actúa en forma sinérgica con la agregación de las integrinas y con la unión a ligando para conectar el citoesqueleto al receptor (62). Además, FAK promueve el acoplamiento (directo o indirecto) de moléculas transductoras de señales a las integrinas. (61, 63, 64).

Además de asociarse con moléculas citoplasmáticas, las integrinas interaccionan con moléculas transmembranales. En los sitios de adhesión focal también se agregan receptores a factores de crecimiento. La adhesión mediada por las integrinas provoca un sinergismo en la fosforilación de receptores con actividad de tirosina cinasa (TCR) después de la unión de éstos a su agonista (factores de crecimiento) (65). Moléculas de la superfamilia 4 de moléculas transmembranales (TM4SF) como CD9, CD53, CD63, CD81 y CD82, también se asocian con las integrinas (66). Se ha sugerido que los complejos integrinas/TM4SF participan en la regulación de la motilidad celular.

En la **tabla 3** se enumeran las proteínas asociadas a las integrinas en los sitios de adhesión focal, mientras que en la **figura 3** se esquematizan.

Tabla 3. MOLÉCULAS ASOCIADAS A LAS INTEGRINAS EN SITIOS DE ADHESIÓN FOCAL. (61, 67).

Tipo	Moléculas
Proteínas de citoesqueleto.	α -actina; talina; vinculina; tensina; paxilina; f-actina
Moléculas transductoras de señales que contienen dominios SH. (Dominio de homología a Src).	Grb2; PI-KC; Fosfolipasa C; Shc, Csk Src, Crk,
GTPasas de bajo peso molecular	ras; rho, mSOS1. C3G, RasGAP.
Reguladores de GTPasas (factores intercambiadores de nucleotidos)	SOS; C3G; GAP
Proteínas de la superfamilia de cuatro dominios transmembranales (TMSF4)	CD 9, CD 53, CD 63, CD 81, CD 82.
Receptores de factores de crecimiento.	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento asociado a heparina.
Cinasas	Cinasa de adhesión focal (FAK); Scr; Proteína cinasa C (PKC); MAP cinasa (MAPK); Jun amino terminal cinasa (JNK); Fgr, Syc.

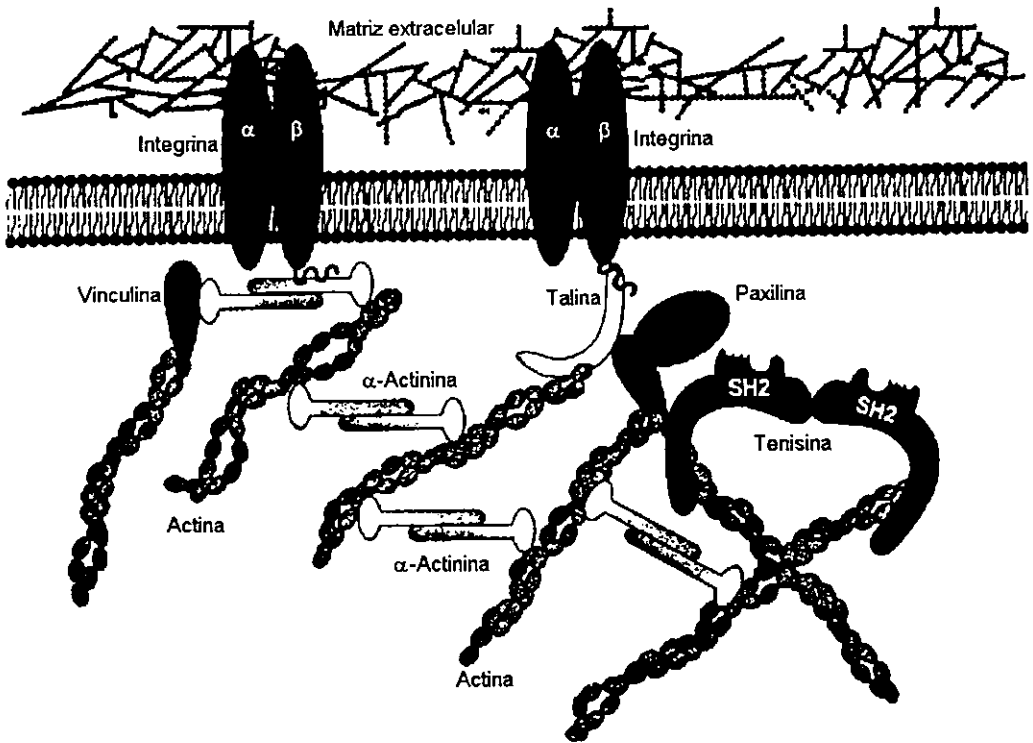


Figura 3. Sitio de adhesión focal (61, 67).

Arreglo de las proteínas de citoesqueleto en los sitios de adhesión focal, como consecuencia de la unión de integrinas a proteínas de matriz extracelular.

Las integrinas participan en diversos procesos fisiológicos.

Las integrinas, como componentes principales de los sitios de adhesión focal, juegan un importante papel en los procesos biológicos siguientes:

Mantenimiento de la arquitectura tisular. La organización funcional de los epitelios depende en gran parte de moléculas de adhesión que pertenecen a las familias de las integrinas y de las cadherinas. se sabe que en los tejidos epiteliales, las integrinas que ligan colágena y laminina ($\alpha1\beta1, \alpha2\beta1, \alpha6\beta1$) Se encuentran presentes en gran cantidad en las células de la capa basal.

Regulación de la motilidad y el tráfico celular. Las integrinas participan en la migración de los fibroblastos y de las células epiteliales a través del tejido conectivo, regulando la adhesión a la matriz extracelular. La adhesión mediada por las integrinas $\alpha v\beta3, \alpha5\beta1$ y $\alpha4\beta1$ puede alterar la expresión de metaloproteasas, regulando así la migración a través del tejido conectivo. (68, 69). Algunas integrinas son inducibles por citocinas proinflamatorias, y están involucradas en la adhesión fuerte de leucocitos al endotelio vascular y en la posterior extravasación (50).

Proliferación celular. En las células normales se ha observado que durante la proliferación es necesario que las integrinas expresadas en la superficie de las células se encuentren adheridas a su sustrato, para que se pueda llevar a cabo el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (70-72). Las células neoplásicas pueden proliferar sin que exista dependencia de la adhesión. La adhesión mediada por las integrinas unidas por su dominio citoplasmático a la proteína adaptadora Shc, coopera con mitógenos para promover el avance a través de la fase G1 del ciclo celular (64).

Regulación de la apoptosis dependiente de adhesión. La mayoría de las células normales requieren estar adheridas para sobrevivir; las células epiteliales que son separadas de las proteínas a las que se encuentran adheridas, o a las que se les impide adherirse, cultivándolas en suspensión, se vuelven apoptósicas (fenómeno llamado *anoikis*) (73, 74). La supresión de la apoptosis parece estar mediada por la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) (75). Como ya se mencionó, esta cinasa puede unirse al dominio citoplasmático de la subunidad β de las integrinas, y ser activada como consecuencia de la adhesión mediada por las integrinas.

IMPORTANCIA DE LAS INTEGRINAS EN EL PROCESO METASTÁSICO.

El proceso de invasión y de metástasis es una compleja cascada de eventos de adhesión; las células tumorales presentan alteraciones tanto en la adhesión célula-célula como en la adhesión célula-sustrato. Los cambios genéticos y moleculares necesarios para que una célula tumoral pueda invadir y metastasizar no se han identificado en su totalidad. Sin embargo la inhibición de la capacidad invasiva constituye una nueva opción en el tratamiento de las neoplasias malignas (76). El estudio de los receptores celulares que median dichos eventos adhesivos es importante en la búsqueda de terapias que inhiban la diseminación tumoral (77).

La adhesión mediada por las integrinas es crucial en la generación de las metástasis. Tanto en células transformadas como en tumores *in vivo* se han observado cambios en el patrón de expresión de las integrinas y/o de algunas moléculas relacionadas. Se han utilizado diversos modelos para demostrar que la modificación en el patrón de expresión y/o la modificación de la funcionalidad de las

integrinas, se correlaciona con la capacidad metastásica. La participación de estos receptores en las diferentes etapas del proceso metastásico se resume a continuación.

Angiogénesis intratumoral.

La formación de nuevos vasos sanguíneos en el seno del tumor es indispensable para el crecimiento tumoral y para la diseminación de las células tumorales por el torrente sanguíneo. Se sabe que las células tumorales pueden secretar factores angiogénicos que provocan cambios en los comportamientos adhesivo, migratorio y proliferativo de las células del endotelio vascular. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) aumenta en 400 % las concentraciones de las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ en las células endoteliales, lo cual favorece su migración. Una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dichas integrinas producen, en un modelo murino, un decremento de 90% en la formación de vasos sanguíneos promovida por VEGF (78).

La integrina $\alpha v\beta 3$ participa activamente en la angiogénesis y en el crecimiento del tumor; la expresión de esta molécula se incrementa en células vasculares como respuesta a factores de crecimiento o factores angiogénicos tumorales (79). Utilizando antagonistas de la integrina $\alpha v\beta 3$ (anticuerpos ó péptidos cíclicos) se ha observado una disminución importante en la neovascularización del tumor en modelos murinos (80). Brooks y cols (81, 82) mostraron que estos antagonistas inducen la apoptosis de las células angiogénicas vasculares proliferativas, y por esto han sido señalados como candidatos a uso terapéutico.

Desprendimiento y movimiento de las células tumorales a partir del tumor primario.

El repertorio de las integrinas en los epitelios normales y en las neoplasias derivadas de estas células ha sido estudiado en carcinomas de pulmón, mama, colon, páncreas y piel. Aunque los resultados son heterogéneos, en todos los casos se ha observado que la expresión de las subunidades $\alpha 2$, y $\alpha 3$ (cuyas integrinas se unen a la colágena o a la laminina) está disminuida o abolida en los tumores más invasivos (39). La integrina $\alpha 6\beta 4$ ha sido correlacionada con el potencial metastásico de diferentes tumores (83-85). La sobre expresión de esta integrina facilita la adhesión y migración *in vitro* de células de carcinoma de colon (86). La expresión de subunidad $\alpha 6$ se incrementa en tumores mamarios invasivos en comparación con su contraparte normal (87). La subunidad $\beta 4$ se expresa en líneas celulares de carcinoma pulmonar altamente invasivas, mientras que no lo hace en aquellas que son pobremente metastásicas (88).

La integrina $\alpha v\beta 3$ puede unirse a varias proteínas, pues reconoce la secuencia RGD contenida en la vitronectina, el fibrinógeno, la trombospondina, la osteopontina, la fibronectina y la laminina. La presencia de esta integrina facilita la interacción y la potencial migración de las células neoplásicas, en prácticamente cualquier tejido en que se encuentren las células durante el proceso metastásico. La integrina $\alpha v\beta 3$ se expresa pobremente en tumores benignos, pero tiene una alta expresión en las metástasis. (24, 89).

Interacción de las células tumorales con las plaquetas.

Las interacciones entre las células neoplásicas y las plaquetas contribuyen a la

diseminación hematológica del cáncer; la inducción de la trombocitopenia puede inhibir la formación de metástasis en modelos murinos (90). La integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, que se expresa tanto en la superficie de plaquetas como en algunas células tumorales, favorece la unión heterotípica entre ambas células. La adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular, bajo condiciones de flujo, es estimulada por la presencia de plaquetas; el bloqueo de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ provoca una pérdida de la capacidad adherente (91). El empleo de bloqueadores de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (anticuerpos o ligandos solubles) inhibe la adhesión entre células tumorales y plaquetas. En un modelo murino estos antagonistas bloquean la colonización del pulmón después de una administración intravenosa de células neoplásicas (metástasis experimental) (90).

Anclaje de las células tumorales en el endotelio vascular y/o la membrana basal subendotelial.

La adhesión de la célula tumoral al endotelio vascular debe ser mediada por moléculas con la suficiente afinidad para permitir una adhesión fuerte, que permita la posterior extravasación. La integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ se expresa fuertemente en tumores malignos, mientras que no se expresa en tumores benignos (24). Esta integrina puede unirse a la glicoproteína PECAM-1 (CD31) que se expresa en el endotelio vascular. La unión mediada por $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ /PECAM-1 puede facilitar la extravasación de las células tumorales (87). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra las integrinas αv , inhiben el desarrollo de melanoma, después de una administración subcutánea y previenen la formación de metástasis experimentales (92).

Existe una correlación entre el aumento en la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) y la capacidad metastásica de melanomas malignos (93). Un estudio que analizó la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en melanomas invasivos y metastásicos, encontró que el 40% de las muestras tenían niveles de expresión aumentados (94). Esta integrina se une a VCAM-1, proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en el endotelio vascular; la interacción VLA-4/VCAM-1 favorece la adhesión fuerte de las células neoplásicas.

Las integrinas $\alpha 6$ son expresadas en la mayoría de los vasos sanguíneos; el bloqueo de esta integrina en la luz de los vasos sanguíneos, previene la colonización del pulmón por células de melanoma metastásico (95). Estos resultados sugieren que las células neoplásicas circulantes pudiesen tener un ligando para la integrina $\alpha 6$. Por otro lado, se sabe que las células neoplásicas interaccionan con laminina en la matriz extracelular subendotelial, usando como receptores las integrinas $\alpha 6$ (87).

Proliferación y supresión de la apoptosis.

La modificación en los niveles de expresión de las integrinas puede alterar tanto la proliferación celular como la supresión de la apoptosis; en ambos casos se favorece el crecimiento tumoral. Los niveles de expresión del receptor de la fibronectina (integrina $\alpha 5\beta 1$) están disminuidos en los fibroblastos transformados, en comparación con los fibroblastos normales (96). Clonas de células ováricas de hámster chino (CHO) que subexpresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ que fueron inyectadas subcutáneamente en ratones desnudos, crecen más rápidamente que aquellas células que sobreexpresan dicha integrina (97). La transfección del receptor de fibronectina en las células CHO

impide que éstas se vuelvan tumorigénicas (98). La expresión constitutiva de las integrinas que contengan la subunidad $\alpha 5$ impide la proliferación de las células tumorales que se encuentran en suspensión (99).

La adhesión a la fibronectina mediada por las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ favorece la supervivencia de las células CHO en ausencia de factores de crecimiento (100). Las integrinas $\alpha 1 \beta 1$ previenen la apoptosis de las células epiteliales que se encuentran unidas a su membrana basal (101). Por otro lado, la disrupción de las interacciones de la integrina $\alpha 3 \beta 1$ promueve la apoptosis de las células de carcinoma del colon y del melanoma (102, 103).

IMPORTANCIA DE LAS MOLÉCULAS ASOCIADAS A LAS INTEGRINAS EN EL PROCESO METASTÁSICO.

La función de las moléculas asociadas a las integrinas en el proceso de invasión y de metástasis aún no se conoce claramente; sin embargo se tienen algunos datos que sugieren que juegan un papel importante; por ejemplo, Gilmore y cols. (104) demostraron que el desplazamiento de la FAK del sitio de adhesión focal provoca un decremento en el número de células que entran a la fase de síntesis del DNA, como respuesta a la incubación en presencia de suero. Cuando células epiteliales son transfectadas con la FAK constitutivamente activa, se vuelven tumorigénicas (75). Los niveles de expresión de la FAK son más altos de lo normal en algunos tejidos metastásicos humanos (105) y la reducción de los niveles de FAK con sondas antisentido inducen el desprendimiento y la apoptosis de varias líneas tumorales (106). Romer L. y cols. (107) postularon que FAK puede estar modificando la proliferación, la

supervivencia y la motilidad celular.

La expresión de CD82 (proteína de TM4SF) se encuentra disminuida en algunas líneas celulares metastásicas derivadas del cáncer prostático (108); cuando se favorece su expresión se provoca la inhibición de las metástasis experimentales. En carcinomas humanos de mama se ha encontrado que los niveles de CD9 son menores en las metástasis localizadas en los nodos linfáticos que en el tumor primario (109). En carcinoma de pulmón de células no pequeñas la expresión de CD9 correlaciona con una mayor supervivencia (110). En una línea de melanoma murino la expresión constitutiva de CD9 inhibe las metástasis experimentales (111). De manera similar la expresión de CD63 causa un menor crecimiento de las células del melanoma humano implantadas intradérmicamente en ratones desnudos y una reducción en el número de metástasis experimentales (112).

INHIBIDORES DE LA ADHESION QUE INTERFIEREN CON LA FUNCIÓN DE LAS INTEGRINAS.

Inhibidores que contienen la secuencia Arginina-Glicina-Aspartato.

La secuencia peptídica Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) es reconocida por muchas integrinas como sitio de adhesión (49). La utilización de péptidos que contienen esta secuencia favorece la adhesión cuando se encuentran formando parte de una proteína, mientras que la inhiben cuando se encuentran en solución. Desde hace varios años se sabe que la administración de péptidos solubles que contienen la secuencia RGD inhibe la formación de las metástasis (113).

Algunos polipéptidos poli-RGD inhibieron las metástasis experimentales en el hígado y el pulmón cuando fueron coinyectados por vía intravenosa con diferentes células tumorales. Su administración repetida disminuyó el número de metástasis generadas a partir de una administración subcutánea de células de melanoma (114-116). La administración de péptidos cíclicos con la secuencia Glicina-Arginina-Glicina-Aspartato-Serina-Prolina-Alanina (GRGDSPA) producen una disminución en el número de metástasis en un modelo murino (117). Pensando que el tripéptido RGD puede ser hidrolizado, Hardan y cols. (118) desarrollaron compuestos no peptídicos que imitan a la secuencia RGD. Estos compuestos inhiben la formación de metástasis y alargan la supervivencia de los animales de experimentación. Una forma polimérica de fibronectina previene la formación de tumores, y disminuye tanto las metástasis espontáneas como las experimentales de varias líneas celulares humanas inoculadas en ratones desnudos (44). En ninguno de los estudios mencionados se observó que los péptidos tuviesen efecto tóxico.

Existen proteínas naturales que contienen la secuencia RGD, que pueden unirse a las integrinas, las cuales son denominadas desintegrinas, algunos de estos péptidos también han sido evaluados como antimetastásicos. La rodostomina, un péptido aislado del veneno de serpiente, ha mostrado ser un fuerte inhibidor de la adhesión a la matriz extracelular de las células del adenocarcinoma de colon, la cual es estimulada por trombina (119). En modelos de melanoma murino cuatro desintegrinas (eristostatina, alborabrina, barbourina, y equistatina) inhiben la formación de metástasis experimentales. La alborabrina es alrededor de 2000 veces más activa que el péptido RGD. La adhesión de alborabrina, barbourina, y equistatina a células de

melanoma fue parcialmente inhibida por anticuerpos anti- αv , lo cual sugiere que pueden estar interfiriendo con la función de las integrinas que contienen la subunidad αv (120). Los efectos de eristostatina en la extravasación de las células neoplásicas se ha estudiado mediante videomicroscopia; el tratamiento con eristostatina provoca un ligero incremento en el anclaje sobre el endotelio vascular, pero no modifica la extravasación ni la migración a través de la matriz subendotelial. Morris y cols. (121) piensan que la eristostatina puede estar influyendo en el crecimiento de las células después de la extravasación. La eristostatina bloquea la adhesión de células de melanoma a VCAM-1 (ligando de VLA-4), pero no a otros ligandos; por lo que, posiblemente, este compuesto inactiva preferentemente a la integrina $\alpha 4\beta 1$ (122).

Aunque la secuencia RGD es reconocida por muchas integrinas, se han encontrado péptidos que contienen esa secuencia, pero se unen selectivamente a determinada integrina (49). Un nonapéptido cíclico con la secuencia Cisteína-Aspartato-Cisteína-Arginina-Glicina-Aspartato-Cisteína-Fenilalanina-Cisteína, que es expresado en la superficie de un bacteriófago, se une con alta afinidad a las integrinas αv . Cuando el bacteriófago que expresa la secuencia mencionada, es inyectado por vía intravenosa a un ratón con tumor, el bacteriófago se concentra en el tumor y no en los tejidos normales (123). Este tipo de péptidos selectivos pueden utilizarse para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, pues tienen una gran afinidad por el tejido tumoral.

Reguladores de otro tipo.

Pullman y Bodmer (124) identificaron, en 1992, un producto génico que

participa en la regulación de la adhesión mediada por las integrinas a moléculas de la matriz extracelular. Dicha proteína incrementa la adhesión a la colágena mediada por la integrina $\alpha 1$, sin afectar la expresión del receptor; por esto se le nombró regulador de la adhesión celular (CAR). La expresión del CAR correlaciona inversamente con la capacidad metastásica de los tumores colorectales y hepáticos (125, 126). Laurer y cols. (127) probaron el efecto de análogos de CAR, sobre la capacidad adherente de células de melanoma a la colágena tipo IV. Los análogos probados corresponden a los cinco aminoácidos del dominio amino terminal de la proteína CAR; el primero con la secuencia Valina-Glutamato-Isoleucina-Leucina-Tirosina-NH₂, y el segundo con la cadena lateral de la tirosina fosforilada (Valina-Glutamato-Isoleucina-Leucina-Tirosina(PO₃₂-)-NH₂). La incorporación intracelular de cualquiera de los péptidos produjo una inhibición en la adhesión de manera dependiente de la dosis, siendo más potente aquel en el que la tirosina estaba fosforilada. Los ensayos de inmunoprecipitación demostraron que estos pentapéptidos se unen a la vinculina (una proteína asociada con el citoesqueleto de actina), por lo que los pentapéptidos pueden estar afectando el adecuado ensamble de los sitios de adhesión focal (127).

Los dominios de unión a los cationes divalentes, los cuales son esenciales para la adquisición de la capacidad de unión al ligando por las integrinas, están próximos al sitio de unión al ligando. Algunos péptidos derivados de los dominios de unión a catión pueden unirse a diferentes sustratos, inhibiendo así la adhesión celular. (128).

IV. CONCLUSIONES.

Las integrinas son receptores que median interacciones célula-célula y célula-sustrato, por lo tanto participan activamente en los eventos adhesivos necesarios para la formación de metástasis.

La alteración en la expresión de las integrinas, es crucial para favorecer el proceso de invasión y de metástasis.

En modelos experimentales, las alteraciones inducidas en la funcionalidad de algunas integrinas pueden disminuir la capacidad metastásica.

Una de las maneras de regular la capacidad adherente de las integrinas es la utilización de péptidos que contienen la secuencia RGD.

Las moléculas asociadas a integrinas en los complejos de adhesión focal participan de forma importante en el proceso de invasión y metástasis. Se ha demostrado que la modulación en la expresión o la alteración de la actividad de las moléculas asociadas a integrinas altera la capacidad invasiva. Por lo anterior, las moléculas asociadas a integrinas deben considerarse ser blancos farmacológicos para el desarrollo de nuevas terapias adyuvantes para el tratamiento del cáncer.

PERSPECTIVAS

Existen algunas moléculas que contienen la secuencia peptídica RGD, dado que estas han mostrado tener efecto inhibitorio en la formación de metástasis, pueden ser tomadas como base para el diseño y desarrollo de fármacos que puedan proporcionar nuevos tratamientos contra el cáncer.

Adicionalmente, existe la posibilidad de encontrar principios activos que modulen la expresión de las integrinas asociadas a la progresión tumoral. Con inhibidores específicos de una integrina puede atacarse selectivamente alguna etapa de la cascada metastásica, pues la importancia de la participación de determinada integrina es variante en cada etapa .

En condiciones normales, la afinidad de las integrinas está modulada por reguladores fisiológicos. Para una regulación eficiente es necesaria la existencia de activadores y represores tanto extracelulares como intracelulares. Recientemente se han descubierto moléculas con propiedades reguladoras sobre la función de las integrinas; sin embargo la caracterización completa de esas moléculas aún esta en proceso. El estudio de los mecanismos de síntesis, movilización, degradación e interacción de esos reguladores con las integrinas podrá permitir el diseño de fármacos que alteren las funciones de los activadores y de los represores en cuestión y, como consecuencia, modulen la adhesión mediada por las integrinas.

V. BIBLIOGRAFÍA.

1. Balmer C, Wells A. Basics principles of cancer treatment and cancer chemotherapy; en: Tannock I, Hill R. The basics science of oncology. 3rd ed. Mc Graw-hill, USA 1998.
2. Hellman S, Vokes E. Advancing current treatments for cancer. Scientific American. Special issue: What you need to know about cancer? 1996 275;3:84-89.
3. Grana X, Reddy E. Cell cycle control in mammalian cell; role of cyclins, cyclins dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Oncogene 1995; 11: 211-219.
4. Sclafani R. Cyclin dependent kinase activating kinases. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 788-794.
5. Lew D, and Kornbluth. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. 1996; 8: 795-804.
6. Darnel J, Baltimore D, Lodish H. Molecular cell biology. 1ª ed. Scientific American Books USA 1986:1035-1074.
7. Voet D, Voet J. Biochemistry . Segunda edicion, John Wiley and sons Inc. 1995 USA 1180-1189, 1275-1288.
8. Varmus H, Weinberg R. Genes and biology of cancer. Scientific American Library 1993.
9. Weinberg R. How cancer arise?. Scientific American. Special issue: What you need to know about cancer? 1996 275;3:32-40.
10. Greenblatt M, Bennett W, Holstein M, Harris C. Mutation in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54: 4855-4878.
11. Ruoslahti E. How cancer spread?. Scientific American. Special issue: What you need to know about cancer? 1996 275;3:42-47.
12. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. Br J Cancer 1954; 8: 1-15.

13. Fidler I, Hart I. Biological diversity in metastatic neoplasm's: origins and implications. *Science* 1982; 217: 998-1003.
14. Simpson A. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 209-240.
15. Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 302-313.
16. Fidler I. Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry* 1989; 10: 673-680.
17. Tanigawa N, Amaya H, Matsumara M, Shimomatsuya T. Association of tumor vasculature with tumor progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br J Cancer* 1997; 75: 566-571.
18. Silberman M, Partin A, Veltri R, Epstein J. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1996; 79: 772-779.
19. Karaioissifidi H, Kouri E, Arvaniti H, Skifas S, Vasilaros S. Tumor angiogenesis in node-negative breast cancer: relationship with lapse free survival. *Anticancer Res* 1996; 16: 4001-4002.
20. Kohlberger P, Bancher-Todesca D, Tempfer C, Sliutz G, Leudolter S. Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 204-209.
21. Srivastava A, Laidler P, Davies R, Horgan K, Hughes L. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness skin melanoma. *Am J Pathol* 1998; 133: 419-423.
22. Greber T, Osmian C, Jacks T. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 1996; 379: 88-91.
23. Nowell P. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986; 46: 2203-2207.
24. Albelda S, Mette S, Elder D, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, *et al.* Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990; 50: 6757-6774.
25. Hynes R. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
26. Liotta L. Tumor invasion and metastasis role of the extracelular matrix. *Cancer Res*

- 1986; 46: 1-7.
27. Mignatti P, Rifkin D. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73: 161-195.
 28. Condelis J. Life at the leading edge: The formation of cell protrusions. *Annu Rev Physiol* 1993; 9: 411-414.
 29. Guirguis R, Margulies I, Taraboletti G, Liotta L. Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumor cell migration. *Nature* 1987; 329: 261-263.
 30. Arkona C, and Wiederanders B. Expression, subcellular distribution and plasma membrane binding to cathepsin B and gelatinases in bone metastatic tissue. *Biol Chem* 1996; 337: 695-702.
 31. Sloane B, Moin K, Krepela E, Rozhin J. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: The role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 333-352.
 32. Edward M, MacKie R. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions during melanoma cell invasion and metastasis. Melanoma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res* 1993; 53: 4376-4382.
 33. Mundy G, De Martino S, Rowe D. Collagen and collagen derived fragments are chemotactic for tumor cells *J Clin Inves* 1981; 68: 1102-1105.
 34. Taraboletti G, Roberts D, Liotta L. Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol* 1987; 105: 2409-2415.
 35. Liotta L, Kleinerman J, Saidel G. Quantitative relationships of intravascular tumor cells: tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974; 34: 997-1003.
 36. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 1990; 54: 159-211.
 37. Hilgard P. Anticoagulants and tumor growth: Pharmacological considerations. En: Nicholson G, Milas L. *Cancer invasion and metastasis: Biologic and therapeutic aspect*. New York. Raven press. 1984: 353-360.
 38. Halaban R, Kwon B, Gosh S, Delli B, Baird A. BFGF as an autocrin growth factor for human melanocytes. *Oncogen Res* 1988; 3:1 77-186.

39. Albelda S. Biology of disease. Role of integrins and other adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 1993; 68: 4-17.
40. Sugarbaker E. Patterns of metastasis in human malignancies. *Cancer Biol Rev* 1981; 2: 235-278.
41. Plesnicar S. Mechanisms of development of metastases. *Crit Rev Oncog* 1989; 1: 175-194.
42. Chambers A. and Hill R. Tumor progression and metastasis. En Tannock I. and Hill R. *The basic science of oncology*. 3era edicion Ed. McGraw hill USA 1998.
43. Nicolson G. Organ specificity of tumor metastasis: Role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev* 1988; 7: 143-188.
44. Pasqualini R, Bordoulous S, Koivunen E, Woods V, Ruoslahti E. A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nature Med* 1996; 2: 1197-1303.
45. Ruoslahti E. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 1413-1417.
46. Hynes R. Integrins, a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-555.
47. Stuiver I, Ruggeiro Z, Smith J. Divalent cations regulate the organization of integrins $\beta 3$ and $\alpha \beta 5$ on cell surface. *J Cell Physiol* 1996; 168: 521-531.
48. D'Souza SE, Haas TA, Piotrowicz RS, Byers-Ward V, McGrath DE, Soule HR, *et al*. Ligand and cation binding are dual function of a discrete segment of the integrin $\beta 3$ subunit; cation displacement is involved in ligand binding. *Cell* 1994; 79: 659-667.
49. Ruoslahti E. RGD and other related sequences for integrins. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 697-715.
50. Imhof B, Dunon D. Leukocyte migration and cell adhesion. *Adv Immunol* 1995; 58: 345-417.
51. Elices M, and Helmer M. The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and collagen/laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9906-9910.
52. Kirchofer D, Languino L, Ruoslahti E, Pierschbacher M. $\alpha 2 \beta 1$ integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem* 1990; 266:

4471-4477.

53. Staatz W, Rajpara S, Wayner E, Carter W, and Santoro S. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediated the Mg^{2+} -dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 1989; 108: 1917-1924.
54. Conforti G, Zanetti A, Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D, Negroz P, Dejana E. Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition. *J Biol Chem* 1990; 265: 4011-4019.
55. Kirchhofer D, Gailit J, Ruoslahti E, Grzesiak J, Pierschbacher M. Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor Gp IIb/IIIa. *J Biol Chem* 1990; 265: 4325-4330.
56. Wilkins J, Stopaack D, Stewart S, Caxia B. Integrin-mediated lymphocyte adherence to extracellular matrix is enhanced by phorbol ester treatment *Eur J Immunol* 1991; 21: 517-522.
57. Kieffer N, and Phillips D. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 63: 29-357.
58. Kouns W, Wall C, White M, Fox C, Jennings L. A conformational-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol* 1989; 108: 1917-1924.
59. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 463-519.
60. La Flamme S, Auer K. Integrin signaling. *Sem Cancer Biol* 1996; 7: 111-118.
61. Clark E, Brugge J. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268: 233-239.
62. Yamada K, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 681-689.
63. Schlaepfer D, Hanks S, Hunter T, Van der Geer P. Integrin mediated signal transduction linked to ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372: 786-885.
64. Wary K, Mainiero F, Isakoff S, Marcantonio E. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; 87: 733-743.
65. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind J, Yamada K. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosin kinases and MAP kinase

- activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 1996; 135: 1633-1642.
66. Helmer M, Mannion B, Berditchvski F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287: 67-71.
67. Yamada K. and Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Op Cell Biol* 1995; 7: 681-689.
68. Seftor R, Seftor E, Gehlsen W, Stetler-Stevenson P, Brown E, Ruoslahti E, Hendrix M. Role of the α v β 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1557-1561.
69. Huhtala P, Humpries M, McCarthy J, Tremble P, Werb Z, Damsky C. Cooperative signaling by α 5 β 1 and α 4 β 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 1995; 129: 867-879.
70. Guadano T, Ohtsubo, Roberts J, Assoian R. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 1993; 262: 1572-1575.
71. Kuzumaki T, Matsuda A, Kikukatsu Y, Ishikawa K. Cell adhesion to substratum and activation of tyrosin kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1310: 185-192.
72. Fang F, Gertraud O, Nobumoto N, Hunter T, Ruoslahti E. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science* 1996; 271: 499-502.
73. Firsh S, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 124: 619-626.
74. Ruoslahti E, Reed J. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-478.
75. Firsh S, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui P. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996; 134: 793-799.
76. Ruoslahti E, Reed J. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-478.
77. Ruoslahti E, Giancotti F. Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells* 1989; 1: 119-126.
78. Senger D, Claffey K, Benes J, Perruzzi C, Sergiou A, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through α 1 β 1 and

- alpha2beta1 integrins. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 13612-13617.
79. Van Waes C, Surh D, Chen Z, Kirby M, Rhim J, Brager S, et al. Increase in suprabasilar integrin adhesion molecule expression in human epidermal neoplasms accompanies increased proliferation occurring with immortalization and tumor progression. Cancer Res 1995; 55: 5434-5444.
80. Brooks P, Montgomery A, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 1994; 79: 1157-1164.
81. Brooks P, Stromblad S, Kleme R, Sarkar F, Cheresch D. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. J Clin Invest 1995; 96: 1815-1822.
82. Varner J, Cheresch D. Integrins and cancer. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 724-730.
83. Mariani-Costantini R, Falcioni R, Battista P, Zupi G, Kennel S, Colasante A, et al. Integrin (6/4 expression in human lung cancer as monitored by specific monoclonal antibodies. Cancer Res 1990; 50: 6107-6112.
84. Carico E, French D, Bucci B, Falcioni R, Vecchione A, Mariani-Costantini R. Integrin (4 expression in the neoplastic progression of cervical epithelium. Gynecol-Oncol 1993; 49: 61-63.
85. Van Waes C. Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. Head Neck 1995; 17: 140-147.
86. Chao C, Lotz M, Clarke, Mercurio A. A function for the integrin (6/4 in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. Cancer Res 1996; 56: 4811-4809.
87. Imhof B, Piali L, Gisler R, Dunon D. Involvement of (6 and (v integrins in metastasis. Curr Top Microbiol Immunol 1996; 213: 195-203.

88. Falcioni R, Cimino L, Perrotti D, Rizzo M, Sacchi A. $\alpha 6/\beta 4$ integrin in lung carcinoma in Cancer and Inflammation. In: Epenetos A, Pignatelli M, Editors. Cell adhesion molecules in cancer and inflammation. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1995: 45-58.
89. Nip J, Shibata H, Loskutoff D, Cheresch D, Brodt P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin $\alpha v \beta 3$ to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* 1992; 90: 1406-1413.
90. Nierodzik M, Klepfish A, Karpatkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb Haemost* 1995; 74: 282-290
91. Dardik R, Kaufmann Y, Savion N, Rosenberg N, Shenkman B, Varon D. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell $\alpha(v)$ integrins. *Int J Cancer* 1997; 70: 201-207.
92. Mitjans F, Sander D, Adán J, Sutter A, Martinez J, Jäggle C, et al. An anti- αv integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci* 1995; 108: 2825-2838.
93. Rice G, Bevilacqua M. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 1989; 246: 1303-1306.
94. Albelda S, Buck C. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-2880.
95. Ruiz P, Dunon D, Sonnenberg A, Imhof B. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for $\alpha 6$ integrins. *Cell Adh Comm* 1993; 1: 67-87.

96. Plantefaber L, Hynes R. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 1989; 56: 281-290.
97. Schreiner C, Fisher M, Hussein S, Juliano R. Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res* 1991; 51: 1738-1740.
98. Giancotti F, Ruoslahti E. Elevated levels of the $\alpha 5$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 1990; 60: 849-859.
99. Varner J, Emerson D, Juliano R. Integrin $\alpha 5$ expression negatively regulates cell growth: reversal attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 725-740.
100. Zhang Z, Vuori K, Reed J, Ruoslahti E. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6161-6165.
101. Bordeau N, Sympson C, Werb Z, Bisell M. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267: 891-893.
102. Bates R, Buret A, Van Helden D, Horton M, Burns G. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contacts. *J Cell Biol* 1994; 125: 403-415.
103. Montgomery A, Reisfeld R, Cheresch D. Integrin $\alpha 3 \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8856-8860.
104. Gilmore A, Romer L. Inhibition of FAK signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1209-1224.
105. Weiner T, Liu E, Craven R, Cance W. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 1993; 342: 1024-1025.

106. Xu L, Owens L, Sturge G, Yang X, Liu E, et al. Attenuation of the expression of focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Diff* 1996; 7: 413-418.
107. Romer L, McLean N, Turner C, Burridge K. Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 349-361.
108. Dong J, Lamb P, Rinker Schaeffer C, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs J, et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995; 268: 884-886.
109. Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang C, Itoi S, et al. Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 4127-4131.
110. Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, Adachi M, Huang C, Koh T, et al. Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 6040-6044.
111. Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M. Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med* 1993; 177: 1231-1237.
112. Radford K, Mallesch J, Hersey P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int J Cancer* 1995; 62: 631-635.
113. Humpries M, Olden K, Yamada K. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 1986; 233: 467-470.

114. Saiki I, Iida J, Murata J, Ogawa R, Nishi N, Sugimura K, et al. Inhibition of metastasis of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptides containing core sequences of cell-adhesive molecules. *Cancer Res* 1989; 49: 3815-3822.
115. Saiki I, Murata J, Iida J, Sakurai T, Nishi N, Matsuno K, et al. Antimetastatic effects of synthetic peptides containing repeated structures of cell adhesive Arg-Gly-Asp (RGD) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) sequences. *Br J Cancer* 1989; 60: 722-728.
116. Murata J, Saiki I. Inhibition of tumor metastasis by synthetic peptides analogues of cell adhesive RGD sequence of fibronectin. *Nippon Rinsho* 1995; 53: 1653-1659.
117. Kumagai H, Tajima M, Ueno Y, Giga-Hama Y, Ohba M. Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 74-82.
118. Hardan I, Weiss L, Hershkovis R, Greenspoon N, Alon R, Cahalon L, et al. Inhibition of metastatic cell colonization in murine lungs and tumor-induced morbidity by non-peptidic Arg-Gly-Asp mimetics. *Int J Cancer* 1993; 55: 1023-1028.
119. Chiang H, Yang R, Huang T. Thrombin enhances the adhesion and migration of human colon adenocarcinoma cells via increased beta3 integrin expression on the tumor cell surface and their inhibition by the snake venom peptide, rhodostomin. *Br J Cancer* 1996; 73: 902-908.
120. Beviglia L, Stewart G, Niewiarowski S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. *Oncol Res* 1995; 7: 7-20.
121. Morris V, Schmidt E, Koop S, MacDonald I, Grattan, Khokha R, et al. Effect of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. *Exp Cell Res* 1995; 219: 571-578.

122. Danen E, Marcinkiewicz C, Cornelissen I, van Kraats A, Patcher J, Ruiter D, et al. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cell. *Exp Cell Res* 1998; 238: 188-196.
123. Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. (v) integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotech* 1997; 15: 542-546.
124. Pullman W, Bodmer W. Cloning and characterization of a gene that regulates cell adhesion. *Nature* 1992; 356: 529-532.
125. Yamamoto H, Itho F, Hinoda Y, Imai K. Inverse association of cell adhesion regulator messenger RNA expression with metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 3605-3609.
126. Yamamoto H, Itho F, Sakamoto H, Nakajima Y, Hinoda Y, Imai K. Association of reduced cell adhesion regulator messenger RNA expression with tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 73: 241-254.
127. Laurer J, Furcht L, Fields G. Inhibition of melanoma cell binding to type IV collagen by analogs of cell adhesion regulator. *J Med Chem* 1997; 40: 3077-3084.
128. Taylor D, Gartner. A peptide corresponding to GPIIb alpha 300-312, a presumptive fibrinogen gamma-chain binding site on the platelet integrin GpIIb/IIIa, inhibits the adhesion of platelets to at least four adhesive ligands. *J Biol Chem* 1992; 267: 11729-11733.