

Melanoma Maligno: Relación con el estroma y la dinámica de su comunicación intercelular.

Guillermo Planas Girón*

(*) Dermatólogo y Dermatopatólogo. Centro Clínico Profesional Caracas, anexo al HCC, piso 3, consultorio 306.
Tel.: (0212) 575.1446. Tel./Fax: (0212) 576.6094. Cel.: (0414) 306.3742. E-mail: guillermoplanas@cantv.net

Resumen

La evolución biológica del melanoma maligno involucra una serie de etapas que pueden ser sintetizadas en la progresión multi-pasos del proceso neoplásico. Estos eventos reflejan las alteraciones genéticas que guían al proceso de transformación progresiva, partiendo de su fase incipiente, cuando el melanocito se encuentra localizado en su nicho epidérmico (unidad melanocítica epidérmica), en franca armonía con sus homónimos y con los queratinocitos, sus células vecinas. Luego pasa por una serie de eventos fisiopatológicos que incluyen la intervención de las moléculas de adhesión con funciones alteradas (caderina-E, caderina-N, cateninas, etc), de interconexión (conexinas), asociadas a la interrupción o inhibición de las uniones intercelulares (uniones GAP), intervención de factores de crecimiento relacionados con el estroma y con la inducción neoplásica (b-FGF, PDGF, VEGF) y aquellos relacionados con la inducción de la linfangiogenesis (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), los cuales juegan un papel importante en la progresión tumoral y en la metástasis.

Se presenta un enfoque general de los aspectos relacionados con la tumorigénesis aplicables al MM, donde se señalan las múltiples alteraciones cromosómicas que subyacen al desarrollo de la célula neoplásica y la especial relación, sustentada por numerosas observaciones clínicas y experimentales, que existe entre la célula neoplásica y las células del huésped: miofibroblastos, células endoteliales, estroma, etc. Figurativamente, hemos viajado con un melanocito con alteraciones genéticas, que ha roto las ataduras con sus similares y con las células queratinocíticas vecinas, en su ambiente epidérmico, pasando por todas las etapas de la progresión tumoral descritas, hasta alcanzar la luz vascular en forma metastásica, adquirir nuevas propiedades adhesivas y formar una nueva neoplasia en el tejido invadido del hospedador.

Palabras clave: Melanoma maligno, Progresión tumoral, Moléculas de adhesión, Caderinas y Cateninas, Factores de crecimiento, Metástasis.

Malignant Melanoma: Relation with the stroma and dynamics of intercellular communication.

Abstract

The biological evolution of malignant melanoma involves a series of stages comprised in the multi-steps progression of the neoplastic process. These events reflect the genetic alterations that guide the progressive transformation process, from an early phase when the melanocyte is located in its epidermal niche (epidermal melanocytic unit), in harmony with other melanocytes, keratinocytes and other neighboring cells. Later, the melanocyte suffer a series of physiopathological events that include altered functions in adhesion molecules (E-cadherin, N-Cadherin, catenines, etc), interconnecting molecules (conexins associated to the inhibition of GAP joints), growth factors associated with stroma and tumor induction (b-FGF, PDGF, VEGF) and those related with the induction of lymphangiogenesis (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), which play an important role in tumor progression and metastasis.

Here, we present a general outlook of various aspects related to the tumorigenesis of MM, pointing out the multiple chromosomal alterations that underline the development of the neoplastic cells and their relationship with host cells: myofibroblasts, endothelial cells, stroma, etc. Figuratively, we have travelled with a melanocyte with genetic alterations that have broken up the ties with other melanocytes and neighboring keratinocytes in the epidermis, passing through different tumor stages, reaching the vascular lumen and acquiring new adhesive properties to form a new neoplasia in the host invaded tissue.

Key Words: Malignant melanoma, Tumor progression, Adhesion molecules, Cadherin, Catenines, Growth factors, Metastasis.

Introducción

Por progresión tumoral se entiende la serie de eventos por medio de los cuales una célula supuestamente normal, produce una célula cancerígena metastásica. El aporte de la experimentación animal, mediante el cáncer inducido por carcinógenos, ha contribuido a definir estos pasos de la progresión tumoral en humanos. El tratamiento en animales de experimentación con carcinógenos químicos, puede conducir a un complejo orden de lesiones proliferativas, una de las cuales en raras ocasiones, puede generar cáncer. Las lesiones tempranas o tumores benignos en estos animales son clonales, estrictamente benignas y de cariotipo diploide¹. Estas lesiones, posterior a un período inicial de crecimiento, se hacen estables y comúnmente regresan, por vía de la diferenciación. El ejemplo más paradigmático lo constituye el nevus melanocítico común y su etapa más tardía de diferenciación, el neuronevus. Estas lesiones bien diferenciadas, son numerosas cuando se les compara con las lesiones tardías de la progresión tumoral. Más tarde, una segunda área de crecimiento celular, puede suceder localmente en una de las lesiones benignas, en una zona arquitecturalmente desorganizada, que puede dar lugar a un pequeño número de células atípicas, indistinguible de las células cancerígenas. Raramente una lesión en crecimiento progresivo, se genera de una pequeña área de una lesión precedente, más bien se trata de un nuevo crecimiento que es parcialmente autónomo e invasivo, mas no metastásico. Este fenómeno es el que ocurre en la fase de crecimiento radial (FCR) del melanoma maligno (MM). Este crecimiento está compuesto estructuralmente por células atípicas y constituye lo que se entiende por cáncer primario. Dentro de esta lesión histológicamente maligna, puede aparecer una nueva población de células a menudo, en forma de patrón de crecimiento esferoidal, globoide, expansivo, en la mayoría de los casos con capacidad metastásica. Corresponde a la fase de crecimiento vertical (FCV) descrita en la histogénesis del MM.

Recientes avances en técnicas de cultivo de tejidos, han permitido la caracterización biológica, inmunológica y genética de melanocitos aislados de piel normal, así como de aquellas lesiones donde se cumplen los pasos de la progresión tumoral.

Evolución Biológica en MM

Antes de describir la serie de eventos interrelacionados que suceden entre MM, sustancias mediadoras y las células del huésped, se hará una breve revisión de las diferentes fases de crecimiento que constituyen las formas biológicas del MM, de modo de facilitar la mejor comprensión de la dinámica de esta interesante y enigmática neoplasia. En primer lugar, para la mejor ubicación de diferentes lesiones melanocíticas, es importante tener presente el interesante concepto de diferenciación melanocítica en el desarrollo normal propuesta por Cramer², representada por las diversas fases de la migración celular, conocidas como:

- a. «estado precursor de la raíz nerviosa»,
- b. «estado migratorio dérmico»,
- c. «estado migratorio de unión», y
- d. «estado dendrítico».

Dentro de cada clase de lesiones, las propiedades de los elementos neoplásicos pueden ser comprendidos en términos de las propiedades de sus contrapartes no neoplásicas, correspondiendo el mayor grado de aberración, a la situación de mayor acción carcinogénica³.

Al «estado dendrítico» intraepitelial corresponde la formación de la «Unidad Melánica Epidérmica» (UME)^{4,5} (**Fig. 1**), una estructura única formada por melanocitos y queratinocitos actuantes en la epidermis. A cada UME, corresponde la relación de 1 melanocito por 8 queratinocitos, alineados a lo largo de la membrana basal del epitelio. Cada melanocito penetra con sus dendritas a las capas superiores del epitelio, transportando melanosomas conteniendo pigmento melánico, para aproximadamente 35 queratinocitos. Esta actividad de transferencia pigmentaria la observamos en lesiones benignas y malignas, como las queratosis seborreicas, ciertos dermatofibromas, melanoacantoma de Mishima, nevus melanocíticos de unión, nevus melanocíticos displásicos (atípicos), así como en MM, etc.

El melanosoma es el organelo especializado dentro del melanocito donde ocurre la síntesis de melanina. Se forma en la parte central del citoplasma del melanocito y migra a través de las extensiones dendríticas, a los sitios de transferencia intercelular en el tope de las dendritas. El melanosoma, completamente melanizado, color negro en el campo microscópico y ultraestructural, es el producto final que ofrece el melanocito al queratinocito («actividad citocrina» de Masson)^{4,5,6}.

A continuación, se resumen los 6 pasos de progresión tumoral indirecta:

Paso 1: Nevus melanocítico adquirido común:

Se inicia al año de edad y continúan apareciendo por aproximadamente dos décadas. Se piensa que a mayor densidad de nevus (moles) ordinarios, mayor será el riesgo relativo para desarrollar MM. Cuando son vistos clínicamente por primera vez, se presentan como manchas aplanadas color marrón (número de melanocitos aumentados en la capa basal) menor de 0,5 cm de diámetro, la cual crece en el transcurso de una a varias décadas de 0,3 a 0,5 cm de diámetro (etapa de formación de tecas en la basal). Se hacen elevados, cesa la síntesis de melanina y luego, o permanece estable o bien desaparece gradualmente (los melanocitos se extienden hasta la dermis superficial y se diferencian gradualmente a los largo de la líneas Schawnianas, finalmente formando una fina red neuro-mesenchimática, antes de desaparecer². Esta sucesión de eventos lo observamos comúnmente en el nevus melanocítico asociado a la pápula fibrosa de la nariz.

Paso 2: Nevus melanocíticos con atipia arquitectural:

Representada por un nevus con persistente atipia arquitectural, pero no citológica. Clínica e histológicamente pueden ser reconocidas áreas de proliferación asimétrica, pero estas lesiones persistentes, fallan en diferenciarse en el aspecto característico del nevus común adquirido (diferenciación aberrante).

Paso 3: Nevus displásico (Atípico):

A la atipia arquitectural, se añade la atipia citológica focal o difusa⁷. Aunque los hallazgos estructurales aparecen, hay poca tendencia al crecimiento continuo de estas células. En la medida en que las unidades celulares melanocíticas, se mantengan separadas, el nevus atípico no mostrará signos de crecimiento autónomo¹, no obstante, estas lesiones son precursoras histogénicas y marcadoras para personas con riesgo aumentado de desarrollar MM (síndrome del nevus displásico, pacientes con antecedentes de MM familiar, etc. Clínicamente las lesiones en el paso 2 y 3, son indistinguibles, de allí que la mayoría de nevus asimétricos enviados para estudio de melanocitos en cultivo, puedan tener muestras de poblaciones celulares en diversas etapas de evolución biológica, lo que dificulta las investigaciones experimentales, no obstante el aporte de las proteasas y otras sustancias enzimáticas en la separación de poblaciones celulares.

Paso 4: FCR (Fase de Crecimiento Radial):

Por criterios histológicos, corresponde a la etapa temprana del MM primario. Las células patológicas están confinadas primariamente al epitelio. Poseen un crecimiento autónomo, pero no tienen competencia demostrable para metastatizar^{1,7-9}. A esta fase corresponde el MM «*in situ*» y la fase temprana del MM Diseminativo Superficial. Cuando esta población celular se inyecta al ratón desnudo, generalmente no es tumorigénica. Esta etapa de FCR del MM se caracteriza por una mezcla íntima de células tumorales con queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, y linfocitos, asociados a modificaciones del estroma. Cada población celular, tanto tumoral como inflamatorias y reactivas, tienen sus interesantes y complejas funciones, aspectos que se abordarán posteriormente.

La FCR, clave para comprender la biología del MM y demostrada en los tres tipos de MM (Melanoma léntigo maligno, Melanoma lentiginoso-acral y Melanoma diseminativo superficial) (Figs. 2 y 3), ha sido ampliamente estudiada y preconizada por el grupo de Clark y col. (Escuela de Pennsylvania) y por Richard Reed y col. (Universidad de Tulane, New Orleans)⁷⁻⁹, así como los aspectos de biología molecular por el grupo de Meenhard Herlyn del Instituto Wistar, Philadelphia^{1,4,10,11}.

Paso 5: FCV (Fase de Cremiento Vertical):

Estas lesiones pueden derivarse dentro de un foco de la FCR del MM, como una nueva población de células que crecen con un patrón y estructura diferente. Por criterios histológicos la FCV correspondería al estado avanzado del melanoma primario. Involucra una transición fenotípica de la FCR a una situación más agresiva, la cual se caracteriza por invasión a la dermis subyacente y el sub-cutis (Figs. 2 y 3). Las células en esta fase, como se dijo anteriormente, tienen capacidad metastásica y son tumorigénica en el ratón desnudo.

Paso 6: MM metastásico:

Las metástasis en MM son similares en forma y biología a las correspondientes a cualquier otro sistema neoplásico. Se estima que las metástasis de 40 a 50% de MM del tipo diseminativo superficial, suceden después de cumplidos todos los pasos de la progresión tumoral. En otros casos, el MM metastásico se inicia en los pasos 3 y 4 de la progresión, evento consistente con la regla 3 de Foulds «la progresión es independiente del crecimiento»¹². Sólo el 8% de los casos de MM, fallan en cumplir los pasos lesionales de la progresión tumoral, p.ej: MM nodular, cuya primera manifestación puede estar a nivel del paso 5^{1,4,7-9}.

Aspectos Fisiopatológicos en la Relación MM-Estroma

Los tumores sólidos consisten en una mezcla variable de células neoplásicas y no neoplásicas. Pudiera definirse como un tejido intrincado, aunque pobremente organizado cuya función es mantenida por el intercambio dinámico entre células neoplásicas y células del huésped¹³⁻¹⁵. La progresión tumoral, descrita anteriormente en la sesión «Evolución Biológica del MM», incluyendo las metástasis es solamente posible a través de la interacción estrecha de ambos componentes. La arquitectura global de un tumor sólido maligno, puede representarse como una masa compacta con una zona central necrótica y una parte vital periférica. Ella contiene una mezcla compleja de células neoplásicas y estroma tumoral, a menudo distribuida en forma de septos irregulares. Estos septos se sitúan en el borde más externo del tumor, referido como «frente invasivo»¹⁶. Rodeando directamente este borde, está un área pobremente definida, en la cual se suceden cambios reactivos tales como edema e inflamación. Es la zona denominada por Herlyn¹⁰ «zona peri-tumoral», para distinguirla del tejido adyacente no comprometido. El estroma consiste en microvasos, tejido conectivo de soporte y células inflamatorias infiltrantes. Los microvasos están delineados por células endoteliales y pueden mostrar cierto grado de cobertura por pericitos, células similares a fibroblastos, y «componentes de la matriz extracelular» (CME), los cuales, conjuntamente, conforman el tejido conjuntivo de soporte. Las funciones asumidas por el

estroma de soporte involucran soporte físico, y transporte celular y de fluidos. Es importante diferenciar el «estroma tumoral» el cual tiene una función de demarcar los aspectos topográficos y estructurales y es restringido a las células no neoplásicas, del concepto de «micro-ambiente tumoral» que implica una total constelación funcional y estructural de células neoplásicas, no neoplásicas y los componentes extracelulares con énfasis en sus aspectos funcionales, los cuales incluyen citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, derivados de células neoplásicas y no neoplásicas.

En el MM, un tumor altamente maligno, con incidencia «*in crescendo*», es notoria su tendencia a las metástasis¹⁷. Las investigaciones han revelado, que en la patogénesis de las metástasis del MM, juegan importante papel: factores de crecimiento, moléculas de adhesión, proteasas y componentes relacionados. Aunque estas investigaciones moleculares se dirigieron con mayor énfasis a las células del MM, se ha demostrado que las células del estroma juegan un papel clave en el proceso metastásico, esto es, proliferación, degradación de la matriz y migración. Se ha adelantado mucho en ciertos aspectos de la investigación biológica del MM, como: rasgos morfológicos del estroma en lesiones melanocíticas¹⁸, análisis de imagen¹⁹, identificación de factores de crecimiento que afectan al estroma y sus distribución en MM²⁰, la identificación de FAP (proteína activadora de los fibroblastos), y los aspectos relacionados con la angiogénesis²¹⁻²³. Las consideraciones generales sobre el estroma tumoral y los hallazgos específicos en MM, plantean importantes interrogantes como: ¿Qué factores físico-químicos y moleculares están involucrados en el proceso mediante el cual, el melanocito, una célula diseñada para convivir estrechamente con los queratinocitos en la UME, en su etapa tardía de diferenciación conocida como «estado dendrítico», carente de actividad migratoria y capacidad proliferativa², abandone su nicho natural y emprenda toda una travesía de progresión tumoral, hasta hacerse tumorigénica y producir metástasis?, ¿Cuáles moléculas están comprometidas en estas interacciones y cómo son reguladas?, ¿Cuáles tipos celulares juegan un papel dominante en las interacciones melanoma-estroma?, ¿Cómo las interacciones melanoma-estroma influyen en la conducta biológica del tumor?. Trataremos de dar respuesta a algunas de estas interrogantes, pero antes pasemos breve revisión del comportamiento de los melanocitos en cultivos de tejidos, para luego entrar en la materia relacionada con las moléculas de adhesión.

Crecimiento de los Melanocitos en Cultivo de MM primario y Metastásico

En MM en FCR, la morfología fusiforme de los melanocitos recuerda más estrechamente nevus melanocíticos benignos que células de MM primario en FCV. No obstante, Herlyn y col.¹, encontraron una línea celular permanente de lesión en FCR

que tenía propiedades similares a células de MM primario en FCV, por lo que deducen que es posible que la FCR, pueda progresar espontáneamente a un fenotipo más maligno en cultivo. También es posible que esta lesión en FCR, pudiera contener unas escasas células completamente transformadas, destinadas a formar FCV. Tales células pudieron haberse convertido en dominantes, en cultivos con pases seriados.

Los melanocitos en la FCV del MM primario, tienen un fenotipo maligno «*in vitro*» e «*in situ*». Estas células pueden mantenerse indefinidamente y formar tumores cuando se inyecta a ratones desnudos atímicos. Morfológicamente las células del MM primario en FCV, son similares a las metastásicas. En el 60% de los cultivos son fusiformes y el resto epitelioides. 20% de las líneas celulares son pigmentadas y tienen elevados niveles de tirosinasa. Las células en todos los cultivos tienen premelanosomas y melanosomas, cuando se examinan mediante ultraestructura.

En los MM metastásicos, las características en cultivo reflejan su crecimiento «*in situ*». A menudo tiene alta eficiencia (50%) en formar colonias, en agar blando¹¹ y formar tumores de crecimiento rápido, cuando se inyectan a ratones desnudos atímicos. Las células en sus inicios son fusiformes, pero posteriormente, después de crecimiento a largo término, puede predominar una forma de patrón epitelioides. De 100 líneas celulares establecidas en el laboratorio de Herlyn y col.¹¹, 20% fueron pigmentadas. Al igual que los melanocitos de todos los estados de progresión tumoral, las células de los MM metastásicos, aún siendo no pigmentadas, contienen premelanosomas.

Desarrollo de Moléculas de Adhesión Intercelular en MM

La expresión de un número de moléculas de superficie celular, que median las interacciones celulares, se asocia con el desarrollo de MM. Estas moléculas incluyen un grupo de las inmunoglobulinas, tales como Mel-CAM (molécula de adhesión celular melanocítica)¹¹, ICAM-1 (molécula 1 de adhesión celular de tipo intercelular)²⁴, integrinas tales como la alfa-1 y beta-1 integrinas²⁵, caderinas, tales como la E-caderina y N-caderina. Estas últimas, por su relevancia en todos estos fenómenos de progresión tumoral, se tratarán en detalle, no sin antes señalar que las interacciones combinadas de todos estos factores, más que uno individual, juegan importante papel en la progresión tumoral del MM.

Moléculas Caderinas en MM (Fig. 4)

Forman una familia de glicoproteínas cuya función es promover la adhesión intercelular dependiente del calcio y sirven como componentes trans-membrana de las uniones adherentes intercelulares.

La E-caderina: es la caderina mayor en células epiteliales polarizadas, mientras que la N-caderina es expresada por neuronas, miocitos y fibroblastos. Las moléculas de

caderinas y el complejo caderina-catenina, están involucrados en el reconocimiento celular durante la embriogénesis y morfogénesis, motilidad celular, integridad tisular y homeostasis²⁶⁻²⁸. Las uniones entre factores de adhesión intercelular, mediados por: caderinas, factor de crecimiento receptor tirosinasa-quinasa, y Wnt, forman una red compleja, cuya interrelación, permite a las caderinas su función de adhesión celular. La organización de tal jerarquía de múltiples componentes, permite a las caderinas, ejercer su función como maquinaria de adhesión celular, así como de receptores señalados, para la comunicación inter e intracelular, resultando en una regulación del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis, tanto en células normales como malignas²⁹. La interrupción de la adhesión mediada por la E-caderina, facilita la invasión tumoral, mientras la restauración de su expresión, resulta en retardo del crecimiento del fenotipo invasivo y metastásico en células carcinomatosas³⁰. De ese modo, la E-caderina es considerada un factor de supresión a la invasión tumoral. Su función puede perderse por: delección o inactivación mutacional del gen de la E-caderina; expresión anormal y localización subcelular anormal de la caderina o de los componentes del complejo de adhesión conteniendo caderina; expresión silenciada por hipermetilación; interrupción del complejo caderina-catenina, causada por fosforilación de cateninas por receptores tirosinasa-quinasa activados³⁰. La E-caderina, también juega un importante papel en el desarrollo del melanoma. Tang y col.³¹, demostraron que la E-caderina, es el mayor factor de adhesión entre melanocitos y queratinocitos. Esto tal vez explique el estado armónico de interrelaciones funcionales entre ambas células a nivel del epitelio. El melanocito, más no la célula névica o las células de melanoma, expresan E-caderina.

La pérdida de E-caderina parece ser uno de los pasos críticos en la progresión del melanoma, porque la pérdida de su función dispararía la liberación de células cancerígenas del foco primario³². Este proceso no se debe tan solo a la pérdida de adhesión física, sino también a múltiples eventos que conducen a una proliferación incontrolada e invasión progresiva. La célula melanocítica puede escapar de su queratinocito vecino, abandonar el nicho epitelial e invadir la dermis. Este fenómeno puede ser explicado mediante un cambio en el perfil de la caderina, de E-caderina a N-caderina durante el desarrollo del melanoma, el cual no solo libera las células de los queratinocitos epidérmicos, sino que confiere nuevas propiedades adhesivas. Se ha propuesto que las células del melanoma forman adhesión mediada por N-caderina y uniones gap mediadas por conexinas, con:

- a. fibroblastos expresando N-caderina,
- b. células endoteliales vasculares y
- c. células de melanoma adyacentes.

Se acepta que biológicamente, el melanoma temprano, puede estar rodeado por membrana basal, la cual, no obstante, se hace progresivamente irregular y disfuncional. El grupo de Herlyn M, Gian Li, y col.^{4,10}, han mostrado expresión forzada de E-caderina por células de melanoma a través de trasducción genética, seguida por co-cultivo con queratinocitos, profundizando las consecuencias sobre el fenotipo de las células de melanoma. Las células del melanoma expresando E-caderina, pueden adherirse a los queratinocitos. Un fenómeno interesante es que las células del melanoma trasducidas, después del co-cultivo con queratinocitos, no siguen expresando moléculas relacionadas con la invasión, como alfa y beta-integrinas o Mel-CAM, por tanto pierden su capacidad invasiva^{33,34}.

A pesar de la pérdida de expresión de E-caderina por células del melanoma «*in vivo*» e «*in vitro*», estas células expresan altos niveles de N-caderina para potenciales interacciones con las N-caderinas de los fibroblastos y células endoteliales, las cuales pueden conferir nuevas propiedades adhesivas a esas células, como se señaló anteriormente.

El fenómeno de la interrupción del género de las caderinas, ha sido ampliamente observado en varios procesos biológicos, tales como: diferenciación y migración durante el desarrollo embrionario, e invasión y metástasis durante el desarrollo tumoral.

Los estudios sobre embriogénesis y morfogénesis del ratón, revelaron que las caderinas, parecen afectar la localización de los melanocitos en la piel^{34,35}.

Los melanocitos son derivados de células progenitoras de la cresta neural. Durante la migración de estas células a la superficie dorso-lateral, los precursores de melanocitos (melanoblastos) no expresan E ni P-caderinas. Entre el día 11 al 13, cuando migran a la epidermis el nivel de expresión de E-caderina aumenta 200 veces. El melanoblasto, luego disminuye la expresión de E-caderina y migra a los folículos pilosos y a la dermis («estado migratorio dérmico» propuesto por Cramer)². En los folículos pilosos los melanocitos expresan grandes cantidades de P-caderina y poco o ninguna E-caderina. Los melanocitos dérmicos expresan N-caderina, pero no E ni P-caderina. En la piel humana normal la E-caderina es expresada sobre la superficie de todas las células epidérmicas, incluyendo queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans, mientras que la P-caderina es expresada sobre queratinocitos en la basal. Esta última caderina se relaciona con la segregación de la capa basal, así como con la distribución de las células epidérmicas en los ductos ecrinos³⁶. Es posible que la E-caderina y la N-caderina, puedan ser inversamente reguladas³⁷. Obviamente, hay que tener en consideración, que el perfil de las moléculas de caderinas en la piel humana, es diferente de la piel del ratón, lo cual refleja la organización estructural diferente en ambos órganos cutáneos.

El factor de crecimiento de los hepatocitos (FCH)

Ha sido señalado que promueve la interrupción de caderinas de E a N-caderina, en células epiblasticas de embrión de pollo, sujetas a transición epitelial-mesenquimática. Aunque la desregulación inicial de E-caderina, parece depender del FCH, las células retienen la expresión de N-caderina, en ausencia de FCH, una vez culminada la transición. Es posible que algo similar ocurra en MM, porque tanto el melanocito como el fibroblasto expresan FCH.

La N-caderina:

Los experimentos han demostrado que estas caderinas, pueden jugar un papel importante en la adhesión tumor-célula del huésped, en la invasión y migración celular tumoral y en la regulación de la expresión genética.

Voura³⁸, sugiere que en la trans migración de células del MM, ambas, las células tumorales como las endoteliales del huésped participan activamente y las caderinas específicas, están involucradas en los diversos pasos del complejo proceso. Los tumores que expresan «*in situ*», N-caderinas, son más invasivos. Hazan y col.³⁹, observaron que la expresión de N-caderina por células de carcinoma mamario, se correlacionaba con invasión y motilidad y sugirieron que la invasión fue potenciada por interacciones entre células cancerígenas y células del estroma, mediadas por N-caderinas, de modo que la migración celular depende de un delicado balance entre adhesión y desprendimiento celular.

Comunicaciones intercelulares de unión GAP (CIUG): (Fig. 1)

Se piensa que juegan papel clave en el mantenimiento de la integridad del tejido normal y en la interrupción de la homeostasis en tejido. Las uniones GAP, tienen como papel unir células adyacentes y permitir la transferencia intercelular pasiva de moléculas de peso molecular bajo como: agua, calcio, segundos mensajeros, azúcares, amino-ácidos, lípidos, drogas, y nucleótidos.

Los promotores tumorales, factores de crecimiento, carcinógenos y oncógenos, generalmente inhiben las CIUG⁴⁰. La pérdida de CIUG parece ser debida a expresión aberrante o localización de conexinas. El papel de las CIUG en MM, no está muy claro. Se ha observado reducción de CIUG en muchos tipos de células neoplásicas, no obstante, se ha comprobado que algunas tienen normal o aún mayor expresión de CIUG y mayor ensamblaje intercelular⁴⁰. Ellas pueden formar uniones GAP funcionales entre ellas (CIUG homólogos), pero a la vez ser incapaces de formar uniones GAP con células no transformadas (CIUG heterólogos). Esta disfunción en comunicación puede ser debida a diferencias sobre la superficie celular. Por ejemplo: Que las moléculas de adhesión intercelular (caderinas), fallen en proveer contacto intercelular apropiado, necesari-

rio para la formación de la unión GAP. La expresión alterada en la línea de las caderinas y la sub-siguiente interrupción en los pares de CIUG atípicos, conduce a comunicaciones de unión GAP anormales entre células malignas y células del huésped, lo que a su vez tendría como consecuencia la proliferación desregulada de células tumorales⁴¹ y por tanto el despeje de la vía metastásica.

Algunos aspectos de Tumorigénesis y Metástasis aplicables al MM

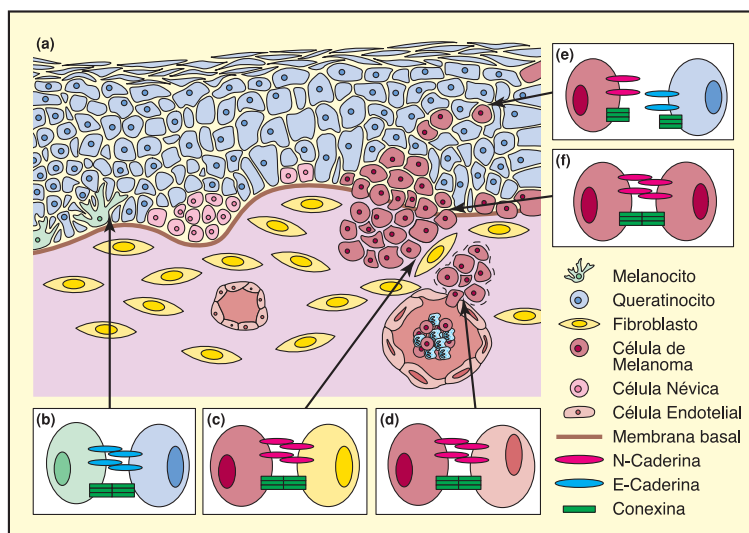
Los eventos que permiten que una célula se convierta en cancerosa y luego metastize, alteran justamente cada parte de la célula, desde el aspecto genético hasta la estructura del esqueleto. Genes mutados o alterados dan lugar a los patrones de crecimiento aberrantes que caracterizan la carcinogénesis. Más tarde la célula cancerosa, desorganizada genéticamente, libera las ligaduras moleculares que la mantienen en el órgano huésped, se alimenta a través del tejido circunvecino para labrar su vía hacia los vasos sanguíneos y conducirse a un nuevo tejido⁴². La célula que antes era sedentaria, se torna móvil, una proeza que requiere que su propio esqueleto se reconfigure para el movimiento⁴³. De modo que en la célula cancerosa, los genes y cromosomas se desorganizan, conduciéndolas a programas genéticos establecidos, pero diferentes a los intentados en el programa normal. En otras palabras, fallan en desarrollar las características y actividades propias de las células maduras de su tipo.

La vida y muerte de una célula, así como todas sus funciones celulares, están bajo estricto control genético. Estos genes encodan proteínas que envían señales de crecimiento para el medio ambiente o la conducen a través de su ciclo replicativo y chequean las anomalías celulares y genéticas. Algunas de estas proteínas regulatorias, hacen la corrección necesaria a los genes dañados. Hay otras proteínas que remueven a las células defectuosas o viejas de su ciclo replicativo y la envían a la vía apoptótica.

En general, se acepta que en la regulación de la proliferación celular, uno o varios de estos genes regulatorios del crecimiento, defectuosos, contribuyen a que las células presenten anomalías cromosómicas y genéticas, que de alguna manera empujan a la célula en una dirección de crecimiento incontrolado. Al comienzo, son formados grupos celulares genéticamente idénticos, cada célula dividiéndose con menos restricción que su contraparte normal, aunque en este punto, todavía no constituye un tumor (es lo que sucede en la etapa incipiente de la FCR del MM). Cuando la masa tumoral alcanza un diámetro de 2 mm, emite señales que alistan al tejido conjuntivo circundante y a las células vasculares, hacia el tumor y lo inducen a crecer dentro de los vasos

Fig. 1: Alteraciones de la comunicación intercelular durante el desarrollo del melanoma.

(a): La estructura de la dermis y epidermis humana: los estados progresivos típicos del desarrollo del MM, son mostrados de izquierda (piel normal) a derecha (MM metastático). Los melanocitos normales residen cerca de la membrana basal y forman la «unidad melanocítica epidérmica» (UME) con 5 a 8 queratinocitos. Generalmente, los nevos adquiridos comunes y congénitos no conllevan anormalidades citogenéticas; se piensa que los nevos melanocíticos displásicos (atípicos) son precursores del MM. Las células de MM proliferan, invaden tejidos vecinos y metastizan a tejidos y órganos remotos. **(b-f):** Señalamiento esquemático de las interacciones intercelulares entre diferentes parejas de melanocitos bajo situaciones normales y patológicas. **(b):** melanocitos epidérmicos normales interactúan con queratinocitos adyacentes a través de las E-caderinas y conexinas. Un cambio en la línea de E- a N-caderina, durante el desarrollo del melanoma, no solo libera a las células de los queratinocitos vecinos **(e)**, sino que le confiere nuevas propiedades adhesivas. Se ha propuesto que las células del MM forman adhesión mediada por N-caderinas y uniones gap mediadas por conexinas con: **(c):**

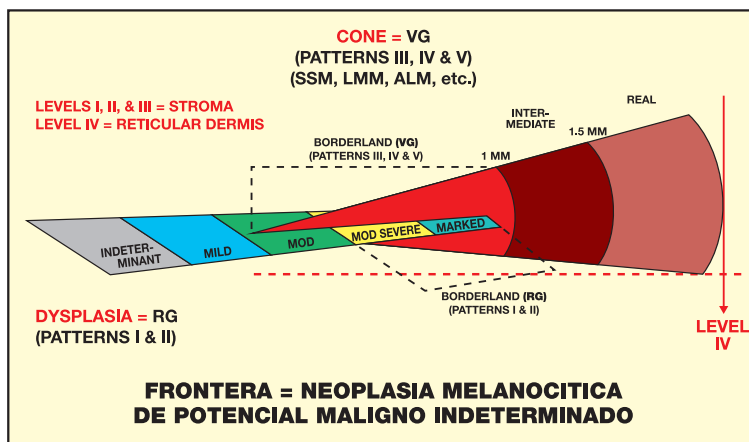


fibroblastos expresando N-caderinas, (d): células endoteliales vasculares y (f): células de melanoma adyacentes.

(Con autorización del Profesor Meenhard Herlyn de su trabajo: Li G and Herlyn M. Dynamics of intercellular communications during melanoma development. Mol Med Today 2000;(6):163-169).

Fig. 2: Los diferentes grados de progresión tumoral están representados en este diagrama.

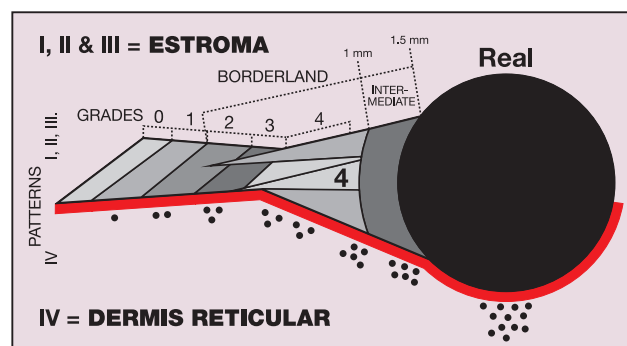
Se observa el estado indeterminado 0 (displasia grado 0). Hay 4 grados determinantes de displasia a lo largo del plano del cono diagramado, correspondiendo la parte más prominente a la zona de mayor displasia. Esta relación permite el reconocimiento del patrón de crecimiento vertical en lesiones delgadas, las cuales se caracterizan por un grado moderado de displasia. El cono tiene dos límites. El primero a 1 mm y el segundo a 1,5 mm en dimensión vertical (diámetro del cono). El dominio a la izquierda de la frontera de 1 mm es la zona límite en la cual el alto grado de displasia y los «melanomas delgados» son pobremente caracterizados, como lesiones límites (representativas de neoplasias melanocíticas límites de potencial maligno indeterminado). El dominio del cono entre 1 mm y 1,5 mm corresponde a una zona intermedia (lesiones melanocíticas intermedias de potencial maligno indeterminado). Las lesiones lejos del dominio de 1,5 mm pueden ser caracte-



rizadas como MM reales. El nivel IV de invasión, está representado como dimensión independiente

(Con permiso del Profesor Richard J Reed, USA, de su trabajo : «Spindle Cell Melanocytic Neoplasms with Desmoplastic Melanoma as an Example» 1999. <http://www.bweems.com>).

Fig. 3: Es una modificación de la Fig. 2 donde se le confiere reconocimiento a la displasia indeterminada (grado 0), enfatizando el dominio de los patrones de crecimiento vertical en la categoría de los MM reales, lejos de 1,5 mm de dimensiones verticales. La displasia indeterminada está caracterizada por atipia mínima en los patrones lentiginosos y de unión y por marcadores mínimos de respuesta inmune del huésped (infiltrado linfóide y fibroplasia laminar). Estas lesiones de «desviación mínima» no son suficientes para ser citadas como marcadores del síndrome de nevus displásico. Por otra parte, éstas lesiones son comúnmente encontradas en un grupo de otras lesiones las cuales tienen características de displasias significantes, como son encontradas en el síndrome de nevus displásico. Las lesiones en nivel III en FCV, tienden a ser nódulos expansivos confinados al «suelo nativo» de la piel (dermis adventicia). Todos los dominios blancos, grises y negros, por debajo del límite del rojo, son estroma (suelo preparado). La variante de patrones de FCV serán encontradas primordialmente en el límite y en categorías intermedias (los dominios del cono). Los MM fusiformes son la excepción a la regla. El límite rojo a lo largo del margen inferior de los dominios blancos, grises y negros, define la interfase entre el «suelo nativo» del melanocito (la epidermis y la dermis adventicia), y el estrato de dermis reticular no preparada. Para melanocitos neoplásicos, la extensión lejos del límite del



rojo, es evidencia de adquisición de nuevas propiedades. Ello significa una transición de células comunales como miembros de la comunidad a nivel III (patrón III) a células migrantes que se extienden hasta alcanzar nivel IV (patrón IV). En esta etapa, las células migrantes no respetan fronteras y realmente invaden no solo la dermis reticular y profunda, sino vasos.

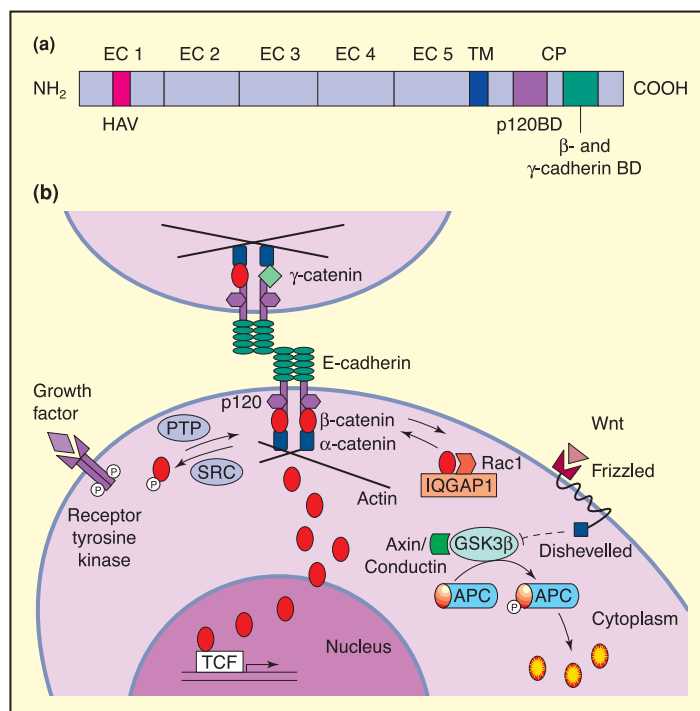
El MM «*in situ*» no está especificado como una lesión separada, porque está comprendida en la categoría de displasia de alto grado (displasia grado III-IV).

(Con permiso del Profesor Richard J. Reed de su trabajo: «Spindle Cell Melanocytic Neoplasia with Desmoplastic Melanoma as an Example» 1999. <http://www.bweems.com>).

Fig. 4: Compromiso de las E-caderinas en la adhesión intercelular, signos de trasducción y regulación de la expresión genética.

Los dominios funcionales de la E-caderina.

(a): La E-caderina es una proteína transmembrana de pasaje simple con un terminal -N, formando el dominio extracelular (EC) y un terminal -C formando el dominio citoplasmático (CP). EC1 a EC 5, representa las 5 unidades de 110 aa de largo cada una. La región His-Ala-Val (HAV) de EC1 es requerida por ligaduras de Ca^{2+} e interacción homotípica. TM representa el dominio transmembrana. Los dominios citoplasmáticos de la E-caderina contienen sitios de ligaduras (BD) que interactúan con proteínas de la familia del armadillo, tales como la beta-cateninas y gamma-cateninas (placoglobinas) y p120. La estructura global de otras caderinas clásicas, tales como la N y la P-caderinas, son similares a la E-caderina y sus dominios citoplasmáticos son altamente conservados (No se muestran). **(b):** Ligadura entre la adhesión intercelular mediada por E-caderinas, factor de crecimiento-receptor de la tirosina-quinasa y la vía Wnt. La beta-catenina juega un papel crítico en la adhesión intercelular mediada por caderina.



(Con autorización del profesor Meenhard Herlyn de su trabajo: Li G and. Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. Mol Med Today 2000;(6):163-169).

sanguíneos. La masa tumoral, literalmente, estimula el crecimiento de su propio aporte sanguíneo a partir de vasos pre-existentes, proceso denominado angiogénesis^{44,45}. Hay evidencias de que la angiogénesis, es probablemente iniciada porque las células de la masa tumoral, especialmente aquellas situadas en el interior, están ávidas de oxígeno. A todo evento, una vez que el aporte sanguíneo esté en el lugar, la masa tumoral puede incorporar oxígeno y los nutrientes necesarios para continuar con el crecimiento⁴⁵. Además, las células tendrían ahora un conducto a través del cual puedan escapar e invadir otros tejidos. Por otra parte, en la angiogénesis, los vasos sanguíneos que rodean al tejido conjuntivo circunvecino, liberan factores (como lo hacen las células vasculares) que estimulan el crecimiento y la motilidad de las células cancerosas. En este sentido, es oportuno señalar brevemente los cuatro factores de crecimiento producidos por las células del melanoma relacionados con los fibroblastos en su papel de formación del estroma y de estímulo del crecimiento neoplásico: bFGF (factor de crecimiento básico de los fibroblastos), de naturaleza autocrina el cual estimula la producción celular neoplásica. PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) el cual actúa como un factor de mantenimiento y supervivencia en la progresión del MM, aparte de que ayuda al tumor para organizar el estroma, incluyendo la producción de matriz extracelular. Este último factor, conjuntamente con el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), modulan el micro-ambiente para beneficiar el crecimiento tumoral y la invasión^{10,46}. TGF- β (factor de crecimiento- β transformante), el cual conjuntamente con el bFGF, y el PDGF, son expresados constitutivamente, sin previa estimulación, por la FCV del MM primario y por células del MM metastásico. Los factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis están presentes en la neovascularización tumoral y las células tumorales son capaces de segregar factores de crecimientos endoteliales como: VEGF-B, VEGF-C, y VEGF D, involucrados en la progresión tumoral y en la metástasis⁴⁶.

Como se mencionó en párrafos anteriores, la porción externa de la E-caderina, forma interconexiones con las moléculas E-caderinas de células vecinas, comparativamente similar a los dientes de una cremallera⁴⁷. La porción interna de la E-caderina conecta a la proteína esquelética interior de la célula, llamada citoesqueleto. Recientemente, se han identificado a las proteínas que ligan la E-caderina al citoesqueleto y son denominadas cateninas. Antes que la célula inicie el movimiento, debe romper primero el complejo multidimensional de interconexión. Las uniones adherentes (CIUG), deben ser desensambladas, a través de la inactivación de las E-caderinas.

La molécula **b-catenina** no solo ayuda en el mantenimiento de la arquitectura tisular, sino que también participa en el señalamiento químico interno celular. La b-catenina se conecta con otra proteína llamada **APC** (poliposis col adenomatosa)⁴⁸, cuya función es eliminar células con mutaciones, vía apoptosis. Cuando la b-catenina se liga a APC evita la división celular, de modo que el crecimiento celular es inhibido. En ocasiones, una u otras de las proteínas de este complejo son alteradas, con la consecuente mutación de genes encodados en ellas, impidiendo que el complejo sea formado. En este caso la b-catenina, ahora ilimitada por el APC, interactúa con el ADN celular y activa varios genes que traen como consecuencia que las células se reincorporen al ciclo celular. De esa forma, sobreviene el crecimiento celular anormal. Del mismo modo que las E-caderinas ligan a las células entre sí, las **integrinas**^{49,50}, ligan las células a proteínas como colágeno en el tejido conjuntivo periférico, así como a proteínas intracelulares (citoesqueleto). La célula tumoral produce menos integrinas, que su contraparte normal, lo que abre el camino a la metástasis. Parece ser que la célula tumoral, poseedora de integrinas diferentes a la que produce la célula normal, ayuda a la primera (invasora) a migrar a través del tejido conjuntivo y/o los vasos sanguíneos.

En el período de remodelación metastásico, hay que tener en consideración que las células epiteliales, en su estado normal, tienen diversas formas: cilíndricas, cuboidales y aplanadas. Su contraparte tumoral, se presenta en ocasiones esteladas, y elongadas y remedan más estrechamente a fibroblastos, que a su célula epitelial de origen. Tal es el caso de los carcinomas epidermoides con patrón pseudosarcomatoso. Similar morfología fibroblástica se observa en células epiteliales durante el desarrollo embrionario. En el caso de los MM, los cuales provienen del melanocito, una célula originada en la cresta neural, y por tanto de origen neuroectodérmico, estos presentan en ocasiones patrones de células fusiformes (MM desmoplásico con patrón pseudosarcomatoso), que remedan a su contraparte normal, situados en las tecas epiteliales y/o intradérmicas que muestran células con histología cuboidales (epitelioides) y otras que son fusiformes y eventualmente mixtas⁵¹.

La célula con capacidad metastásica, antes de abandonar el órgano huésped, adquiere capacidad para horadar al conjuntivo circundante, actividad que realiza mediante las enzimas proteasas, que descomponen proteínas y degradan la barrera conjuntiva. No está claro si la célula tumoral, libera sus propias proteasas, o si estimula la liberación a partir de otras células o si son procesos simultáneos y/o secuenciales. Las **proteasas** son sintetizadas por las células en forma inactiva, por tanto deben ser químicamente procesadas, para convertirse en activas. Por otra parte, las células tumorales también pro-

ducen inhibidores de las proteasas y estos a su vez pueden ser inhibidos por químicos segregados en el conjuntivo. De modo que su paso a través de la barrera conjuntiva, dependerá de una serie de eventos, algunos promoviendo la síntesis o activación, otros evitando su inhibición. Las proteasas segregadas por células endoteliales, pueden jugar un papel importante en la angiogénesis requerida para que el tumor primario crezca y metastase.

Miembros de la familia de las proteasas, llamadas «metalproteinasas de la matriz» (MMIs)⁵² pueden degradar varios componentes de la matriz conjuntiva y son claves en la migración de células tumorales a través de los compartimientos del tejido. Es posible que las MMIs, actúen en varios niveles de la progresión tumoral. Están en plena investigación el papel de varios tipos de proteasas: (cisteína proteasa: cathepsina-B; serinas proteasas: activador del plasminógeno tipo urokinasa). Ahora bien, como las proteasas, son también segregadas en su forma de pro-proteína por los fibroblastos, es posible que explique los estados de «regresión tumoral» total o parcial, que se observan en el MM, mediante la acción lítica de proteasas en combinación con la incorporación de las células tumorales a la vía apoptótica. Sloane et al⁵³, han demostrado que la cathepsina-B, puede encontrarse en el medio ambiente extracelular de células tumorales invasoras, segregadas por las propias células tumorales a partir de macromoléculas reciclables, originadas en los lisosomas intracitoplasmáticos.

Una vez en el vaso, hay grandes probabilidades de que la célula tumoral, sea etiquetada como extraña por el sistema inmunológico y puede ser destruida por PMNs, macrófagos, células natural asesinas, etc.⁵⁴. Hay que recordar que 1 de cada 10.000 células sobrevive, por ello viajan ocasionalmente en grupos celulares, a veces enmascaradas de plaquetas, de modo de burlar el sistema inmunológico.

La célula tumoral, que sobrevive a esta travesía circulatoria, al final alcanza un nuevo tejido, el cual es específico para cada tipo celular. Este tejido es seleccionado de acuerdo a interacciones entre moléculas de superficie de las células tumorales y otras que son expresadas en la superficie de las células endoteliales que delimitan los vasos en el nuevo tejido huésped. Es posible que los carbohidratos que protuyen en la superficie de la célula tumoral, se ligen a algún tipo de carbohidrato receptor sobre la superficie de la célula endotelial (**selectina**)⁴⁶. De ese modo, la célula tumoral está ahora lista para proliferar y formar un nuevo tumor en su nuevo tejido huésped.

Agradecimientos

A la Dra. Aida Falcon de Vargas, por sus valiosas y oportunas observaciones en la lectura del manuscrito.

A los profesores: Meenhard Herlyn (Instituto Wistar, Philadelphia, USA) y Richard J. Reed (Universidad de Tulane, New Orleans, USA), por haber concedido los permisos pertinentes, para la reproducción de los diagramas, tomados de sus respectivos trabajos de publicación mencionados al pie de página en los textos de figuras.

Referencias

- Herlyn M, Clark WH, Rodex U, et al. Biology of disease. Biology of tumor progression in human melanocytes. *Lab Invest* 1987;56(5):44-74.
- Cramer SF. The histogenesis of acquired melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1984;(6)Suppl.1:289-98.
- Cramer SF. The neoplastic development of malignant melanoma. A biological rationale. *Am J Dermatopathol* 1984;(6)Suppl.1:299-308.
- Li Gang and Herlyn M. Dynamics of intercellular during melanoma development. *Mol Med Today* 2000;(6):163-169.
- Breathnach AS: An Atlas of the ultrastructure of human skin. Post-natal Features Development, Differentiation. 1971 J and A Churchill 104 Gloucester Place, London, 135.
- Jimbow K, Quevedo WC Jr, Fitzpatrick TB, Szabó G. Biology of Melanocytes (in) *Dermatology in General Medicine* Vol 1 (eds) Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (Fourth ed) 1993. Mc Graw Hill, INC, NY, pp. 261-89.
- Clark WH, Elder DE, Guerry D, et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathol* 1984;15:1147.
- Clark WH, Elder DE, Van Horn, M. The biologic forms of malignant melanoma. *Human Pathol* 1986;17(5):443-50.
- Elder DE, Guerry D, Epstein MN, et al. Invasive malignant melanoma lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol* 1984;(6)Suppl.1:55.
- Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, and Herlyn M. Melanoma-stroma interactions. Structural and functional aspects. *Lancet Oncology* 2002;(3):35-43.
- Herlyn M, Balaban G, Bannicelli J, et al. Primary melanoma cells of vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst* 1985;(74):283.
- Foulds C. Neoplastic development, 1975. New York Academic Press vol (1):63-93.
- Hanahan D, and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- Park CG, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 2000;6:324-29.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Tumor progression: Defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol* 2001;11:25-27.
- Liotta LA, Steeg P, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis in angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;4:327-36.
- Lotze MT, Dallal RM, Kirkwood JM, et al. Cutaneous melanoma. In De Vita, V.T Jr, Hellman S, and Rosenberg S (eds): *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, ed 6, New York, Lippincott-Raven, 2001:2003-12.
- Clark WH, Hood AF, Jampel RM. Atypical melanocytic nevi of the genital type with a discussion of reciprocal parenchymal-stromal interactions in the biology of neoplasia. *Human Pathol* 1998;29(Suppl 1):1-24.

19. Smolle J, Hofmann-Wellenhof R, Fink-Puches R. Melanoma and stroma: an interaction of biological and pronostic importance. *Semin Cutan Med Surg* 1996;15:326-36.
20. Halaban R. Growth factors and melanoma. *Semin Oncol* 1996;23:673-81.
21. Barnhill RL, Fandrey K, Levy MA, et al. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic nevi and malignant melanoma. *Lab Invest* 1992;67:331-37.
22. Westphal JR, van't Hullenar RG, van der Laak JA, et al. Vascular density in melanoma xenografts correlates with vascular permeability factor expression but not with metastatic potential. *Br J Cancer* 1997;76:561-70.
23. Straume O, Salvesen HB, and Akslen LA. Angiogenesis is prognostically important in vertical growth phase melanomas. *Int J Oncol* 1999;15:595-99.
24. Xie S, et al. Expression of MCAM/MUC 18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 1997;(57):2.295-2.303.
25. Kageshita T, et al. Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res* 1991;(53):4.927-4.932.
26. Martin-Padura I, et al. Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cell correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res* 1991;(51):2.239-2.241.
27. Nesbit M and Herlyn M. Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis* 1999;(14):131-146.
28. Vleminckx K and Kemler R. Cadherin and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bio Essays* (21):211-220.
29. Guilford P. E-cadherin down regulation in cancer: fuel on the fire. *Mol Med Today* (5):172-177.
30. Christofori G and Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999;(24):73-76.
31. Tang A, et al. E-Cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 1994;(107):983-992.
32. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;(153):333-339.
33. Hsu MY, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restore keratinocyte-mediated growth control and down-regulated expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 2000(156):1.515-1.525.
34. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(1):62-70.
35. Murphy M, et al. Neural Stem cell. *J. Investigative Dermatol. Symp Proc* 1997;(2):8-13.
36. Furukawa F, et al. Roles of E- and P-cadherin in human skin. *Microsc Res Tech* 1997;(38):343-352.
37. Islam S, et al. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cell induces a scattered fibroblast phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1996;(135):1.643-1.654.
38. Voura EB, et al. Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cell. *Microsc Res Tech* 1998;(43):265-275.
39. Hazan RB, et al. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 1997;(4):399-411.
40. Trosco JE and Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* 1999(3):208-236.
41. Zhang W, et al. Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res* 1999;(59):1.994-2.003.
42. Bosman FT. The borderline: Basement membranes and the transition from premalignant to malignant neoplasia. *Microscopy Research and Technique* 1994;28:216-225.
43. Boyer B, Vallés AM and Thiery JP. Model systems of epithelium-mesenchyme transitions. *Acta Anatomica* 1996;156:227-239.
44. Brooks PC, Stromblad R, Klemke R, et al. Anti-integrin $\alpha v \beta 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clinical Invest* 1995;96:1.815-1.822.
45. Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, et al. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nature Medicine* 1997;3:515-520.
46. Jussila L and Alitalo K. Vascular growth factors and Lymphangiogenesis. *Physiological Reviews* July 2002;82:673-700.
47. Birchmeier W and Behrens J. Cadherin expression in carcinomas. Role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994;1.198:11-26.
48. Su L-K, Vogelstein and Kinzler. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1.734-1.737.
49. Horwitz AF. Integrins and health. *Scientific American*. May 1997:46-53.
50. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
51. Van Noorden CJF, Meade-Tollin LC and Bosman FT. Metastasis. *American Scientist (On Line)*. March-April 1998:1-21.
52. Heppner KJ, Matrisian LM, Jenssen RA and Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J of Pathol* 1996;149:273-282.
53. Sloane BF, Dunn JR, and Honn KV. Lysosomal cathepsin B: Correlation with metastatic potential. *Science* 1981;212:1.151-1.153.
54. Perera FP. Uncovering new clues to cancer risk. *Scientific American* May 1996:40-46.